

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

Determinación de las mutaciones en los codones 12 y 13 del gen K-RAS, polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 y análisis de la inestabilidad de microsatélites en tumores vesicales no músculo invasivos de riesgo intermedio y alto

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Héctor Garde García

Directores

Jesús Moreno Sierra
Enrique Redondo González

Madrid
Ed. electrónica 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
MÉDICO-QUIRÚRGICAS
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**Determinación de las mutaciones en los codones 12 y 13 del gen K-RAS, polimorfismo
Arg72Pro del gen TP53 y análisis de la inestabilidad de microsatélites en tumores vesicales
no músculo invasivos de riesgo intermedio y alto**

HÉCTOR GARDE GARCÍA

Madrid, 2019

Directores: Jesús Moreno Sierra y Enrique Redondo González



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña. Héctor Garde García
con número de DNI/NIE/Pasaporte 51093448Y, estudiante en el Programa
de Doctorado en Ciencias Médico-Quirúrgicas
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Determinación de las mutaciones en los codones 12 y 13 del gen K-RAS, polimorfismo Arg72Pro del gen TP53
y análisis de inestabilidad de microsatélites en tumores vesicales no músculo invasivos de riesgo intermedio y alto

y dirigida por: Jesús Moreno Sierra y Enrique Redondo González

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 9 de mayo de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
MÉDICO-QUIRÚRGICAS
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**Determinación de las mutaciones en los codones 12 y 13 del gen K-RAS, polimorfismo
Arg72Pro del gen TP53 y análisis de la inestabilidad de microsatélites en tumores vesicales
no músculo invasivos de riesgo intermedio y alto**

HÉCTOR GARDE GARCÍA

Directores: Jesús Moreno Sierra y Enrique Redondo González

Madrid, 2019

DEDICATORIA

A mi mujer y mis hijas, Marta, Carmen y Ana, por ser lo más importante de mi vida.

A mis padres y mi hermana, Jesús, Sagrario y María, por los valores que me transmitieron basados en la humildad y el trabajo diario.

A mis abuelos, tío, y tía-abuela, Gregorio, Benita, Grego y Milagros, por su amor y apoyo incondicional.

La fe ensancha los horizontes de la razón para iluminar mejor
el mundo que se presenta a los estudios de la ciencia.

Cf Carta enc. Lumen fidei (29 Junio 2013).

AGRADECIMIENTOS

A Jesús Moreno Sierra y Enrique Redondo González, directores de esta tesis, por su paciencia y dedicación para sacar adelante este trabajo y por compartir conmigo sus conocimientos enseñándome no sólo a ser mejor médico, sino también mejor persona.

A todos aquellos profesionales que han participado en la realización de este estudio, en especial a Marisa Maestro, Marta Vidaurreta, Cristina Fernández y Manuel Fuentes.

A todos los adjuntos y residentes del Hospital Clínico San Carlos que contribuyeron directamente en mi formación: Dra. Carmen Hernández, Dr. Julio Mayol, Dra. Pérez Contín, Dra. Peña, Dra. Arbeo, Dr. Alonso Lera, Dra. Anula, Dra. Ortiz Oshiro, Dr. Tejerina, Dr. Silmi, Dr. Blázquez, Dr. Blanco, Dr. Hermida, Dr. Olivier, Dr. Gómez, Dr. Delgado, Dr. Rodríguez Molina, Dr. Mohamed, Dr. Sihaded, Dr. Corral, Dr. Ramírez, Dr. Senovilla, Dr. San José, Dr. Resel, Dra. Galante, Dra. Pérez Romero, Dr. Castellón, Dr. Santos, Dr. Campanario, Dr. Casado, Dra. León, Dr. Covaria, Dr. Chávez, Dra. López de Alda, Dr. Ciappara, Dra Galindo y Dr. Calderón.

A Alberto Hernando y Eduardo Useros, no sólo por sus enseñanzas sino también por su amistad.

A las Dras. González López y González Enguita, por la oportunidad que me dan día a día de seguir trabajando y desarrollándome personal y profesionalmente.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO

- ATM: Ataxia telangiectasia.
- BCG: Bacilo de Calmette y Guérin
- BLM: Síndrome de Bloom
- CCT: carcinoma de células transicionales
- Cdc: Ciclo de división celular
- Cis: carcinoma *in situ*
- CUETO: Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- EAU: *European Association of Urology*
- EMAST: *Elevated microsatellite alterations at selected*
- EORTC: *European Organization for Research and Cancer Trials*
- FDA: *Food and Drug Administration*
- FISH: hibridación fluorescente in situ
- HR: *Hazard Ratio*
- HNPCC: *hereditary nonpolyposis colon cancer*
- IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
- INE: Instituto Nacional de Estadística
- ISUP: Sociedad Internacional de Patología Urológica
- MAPK: Proteínas kinasas activadas por mitógenos
- MMC: mitomicina C
- MSI: Inestabilidad de microsatélites
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- REDECAN: Red Española de Registros de Cáncer

- RIQ: Riesgo Intercuartílico
- RFLP: polimorfismo de los fragmentos de restricción
- RNA: Ácido ribonucleico
- RTK: receptores de las tirosin quinasas
- RTUv: Resección transuretral de vejiga
- SEER: *Surveillance, Epidemiology and End Results Program*
- SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica
- SLR: supervivencia libre de recidiva
- SLP: supervivencia libre de progresión
- TUS: Tracto urinario superior
- TVMI: tumor vesical músculo invasivo
- TVNMI: tumor vesical no músculo invasivo.
- UIV: Urografía intravenosa
- Uro-TAC: Urografía -Tomografía axial computerizada
- XP: Xeroderma pigmentos

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Situación actual del cáncer de vejiga en el mundo	1
Situación del cáncer de vejiga en España.....	5
Etiología.....	7
Anatomía Patológica	8
Diagnóstico.....	12
Tratamiento quirúrgico endoscópico.....	14
Riesgo de recurrencia y progresión.....	15
Seguimiento	20
Importancia del problema.....	21
Biología molecular.....	23
Oncogen KRAS	26
Genes supresores: p53	27
Inestabilidad de microsatélites	29
Alteraciones genéticas del carcinoma urotelial	30
Técnicas de estudio de las alteraciones genéticas.....	34
Biomarcadores de carcinoma urotelial vesical	35
HIPÓTESIS	43
OBJETIVOS	45
MATERIAL Y MÉTODOS	47
1. DISEÑO DEL ESTUDIO	47
2. POBLACIÓN A ESTUDIO	47
3. METODOLOGÍA CLÍNICA, MARCADORES Y ANÁLISIS EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD	47
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
5. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	54

RESULTADOS	55
ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	55
ESTADÍSTICA ANALÍTICA	62
ANÁLISIS MULTIVARIANTE	98
DISCUSIÓN.....	101
JUSTIFICACIÓN	101
DISEÑO DEL ESTUDIO	102
METODOLOGÍA CLÍNICA, BIOMARCADORES Y ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	107
ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS	110
CONSIDERACIONES FINALES	119
CONCLUSIONES	121
BIBLIOGRAFÍA.....	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios tumorales.

Figura 2. Diferencias entre el sistema clasificación de la OMS de 1973 y 2004.

Figura 3. Correspondencia entre grados tumorales entre la clasificación de la OMS de 1973 y 2004.

Figura 4. Ciclo celular.

Figura 5. Ruta del factor de crecimiento fibroblástico.

Figura 6. Co-ocurrencia de alteraciones en la vía RTK/RAS/RAF en el carcinoma vesical de alto grado.

Figura 7. Vías moleculares divergente en la oncogénesis de carcinoma urotelial no músculo invasivo y músculo invasivo.

Figura 8. Distribución por estadio y grado tumoral.

Figura 9. Distribución mutación KRAS 12.

Figura 10. Distribución inestabilidad microsatélites BAT25, BAT26 y D2S123.

Figura 11. Distribución polimorfismo Arg72Pro TP53.

Figura 12. Curva de supervivencia libre de recidiva global.

Figura 13. Curva de probabilidad de permanecer libre de recidiva ajustada al número de RTUs previas.

Figura 14. Curva de probabilidad de permanecer libre de recidiva ajustada a la presencia de la mutación KRAS 12.

Figura 15. Curva de probabilidad de permanecer libre de recidiva ajustada a la presencia de BAT 25 MSI.

Figura 16. Curva de probabilidad de permanecer libre de recidiva ajustada a la presencia de BAT 26 MSI.

Figura 17. Curva de probabilidad de permanecer libre de recidiva ajustada a la presencia de D2S123 MSI.

Figura 18. Curva de probabilidad de permanecer libre de recidiva ajustada a la presencia del polimorfismo Arg72Pro del gen TP53.

Figura 19. Curva de supervivencia libre de progresión global.

Figura 20. Curva de probabilidad de permanecer libre de progresión ajustada a la presencia de la mutación en KRAS12.

Figura 21. Curva de probabilidad de permanecer libre de progresión ajustada a la presencia de BAT 25 MSI.

Figura 22. Curva de probabilidad de permanecer libre de progresión ajustada a la presencia de BAT 26 MSI.

Figura 23. Curva de probabilidad de permanecer libre de progresión ajustada a la presencia de D2S123 MSI.

Figura 24. Curva de probabilidad de permanecer libre de progresión ajustada a la presencia del Polimorfismo Arg72Pro del gen TP53.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estimación de nuevos casos y muertes para el año 2016 (Tomado de base de datos SEER. Disponible en: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html>)

Tabla 2. Incidencia, mortalidad y prevalencia a 5 años en población adulta estimadas para 2012 en España. Tomado de Globocan 2012 (IARCD).

Tabla 3. Clasificación TNM de la Union International Contre le Cancer (UICC), actualizada en 2009. 7ª edición.

Tabla 4. Variables para calcular riesgo de recurrencia y progresión y peso específico de cada una. Tomado de EAU Guidelines on Non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1 and cis) 2016.

Tabla 5. Probabilidad de recurrencia y progresión de acuerdo al score total. Tomado de EAU Guidelines on Non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1 and cis) 2016.

Tabla 6. Clasificación según los grupos de riesgo.

Tabla 7. Recomendaciones de tratamiento de acuerdo a la estratificación por riesgos.

Tabla 8. Biomarcadores pronósticos emergentes.

Tabla 9. Antecedentes personales.

Tabla 10. Variables oncológicas.

Tabla 11. Tiempo hasta recidiva/progresión.

Tabla 12. Distribución mutaciones.

Tabla 13. Análisis de la relación entre la mutación KRAS12 y los antecedentes personales.

Tabla 14. Análisis de la relación entre la mutación KRAS 12 y las variables oncológicas.

Tabla 15. Análisis de la relación entre BAT 25 MSI y los antecedentes personales.

Tabla 16. Análisis de la relación entre BAT 25 MSI y las variables oncológicas.

Tabla 17. Análisis de la relación entre BAT 26 MSI y los antecedentes personales.

Tabla 18. Análisis de la relación entre BAT 26 MSI y las variables oncológicas.

Tabla 19. Análisis de la relación entre D2S123 MSI y los antecedentes personales.

Tabla 20. Análisis de la relación entre D2S123 MSI y las variables oncológicas.

Tabla 21. Análisis de la relación entre el polimorfismo Arg72Pro TP53 y los antecedentes personales.

Tabla 22. Análisis de la relación entre el polimorfismo Arg72Pro TP53 y las variables oncológicas.

Tabla 23. Análisis univariante de la relación entre BAT 25 MSI y la mutación KRAS 12.

Tabla 24. Análisis univariante de la relación entre BAT 26 MSI y la mutación KRAS 12.

Tabla 25. Análisis univariante de la relación entre D2S123 MSI y la mutación de KRAS 12.

Tabla 26. Análisis univariante de la relación entre el polimorfismo Arg72Pro TP53 y la mutación de KRAS 12.

Tabla 27. Análisis univariante de la relación entre BAT 26 MSI y BAT 25 MSI.

Tabla 28. Análisis univariante de la relación entre D2S123 MSI y BAT 25 MSI.

Tabla 29. Análisis univariante de la relación entre el polimorfismo Arg72 Pro TP53 y BAT 25 MSI.

Tabla 30. Análisis univariante de la relación entre D2S123 MSI y BAT 26 MSI.

Tabla 31. Análisis univariante de la relación entre el polimorfismo Arg72Pro TP53 y BAT 26 MSI.

Tabla 32. Análisis univariante de la relación entre D2S123 MSI y el polimorfismo Arg72Pro TP53.

Tabla 33. Análisis de la relación entre la SLR y los antecedentes personales.

Tabla 34. Análisis de la relación entre SLR y las variables oncológicas.

Tabla 35. Análisis de la relación entre SLR y las diferentes mutaciones.

Tabla 36. Análisis de la relación entre la SLP y los antecedentes personales.

Tabla 37. Análisis de la relación entre la SLP y las variables oncológicas.

Tabla 38. Análisis de la relación entre la SLP y las diferentes mutaciones.

Tabla 39. Modelo multivariante de Cox

Tabla 40. Modelo multivariante ajustado para el estadio.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Los TVNMI son un grupo heterogéneo de tumores cuya capacidad de recidivar o progresar es variable. Las mutaciones en los codones 12 y 13 del gen KRAS (oncogen), polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 (gen supresor de tumores) y/o la inestabilidad de los microsatélites BAT 25, BAT 26 y D2S123 han sido involucrados en la génesis tumoral de una u otra manera del cáncer vesical. Estos biomarcadores podrían suponer una herramienta que identificase el pronóstico al diagnóstico, con las ventajas que ello puede aportar en su seguimiento.

OBJETIVOS:

1. Analizar la presencia de mutaciones puntuales de los codones 12 y 13 del gen KRAS, el polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 y la inestabilidad de los microsatélites (MSI) BAT 25, BAT 26 y D2S123 en una serie de pacientes diagnosticados de TVNMI (tumor vesical no músculo-invasivo) con riesgo intermedio o alto para la recidiva y progresión.
2. Estudiar su valor pronóstico para la recidiva y progresión.

MATERIAL Y MÉTODOS: Estudio prospectivo observacional en el que durante 12 meses (entre abril de 2012 y abril de 2013), se seleccionó una serie de 74 pacientes diagnosticados de TVNMI de riesgo intermedio y alto para recidiva y/o progresión según los criterios de EAU, a los que se les estudiaron los biomarcadores antes mencionados. Se recogieron los datos obtenidos de los análisis genéticos y se han incluido en una base de datos con las variables clinicopatológicas de interés. Se excluyeron los casos diagnosticados de otras neoplasias.

La asociación entre variables cualitativas se evaluó con el test de Chi Cuadrado o prueba exacta de Fisher. Las variables cuantitativas se compararon con el test de t Student (en

comparaciones de una variable con dos categorías) y las medianas con el test no paramétrico de la mediana. Para el análisis estadístico de la probabilidad de supervivencia se utilizó el método de Kaplan-Meier. Paquete estadístico SPSS 15.0.

RESULTADOS: Se incluyeron 74 pacientes en el estudio. La edad media de los mismos fue de 70,72 años (DE: 10,92). 61 pacientes fueron hombres (82,4%) y 13 fueron mujeres (17,6%). La mediana de tiempo de seguimiento fue de 46,81 meses (Rango Intercuartílico: 33,55-61,65) y la media 45,68 meses (Desviación típica: $\pm 20,31$).

Veinticinco pacientes (33,8%) recidivaron y 3 pacientes (4,1%) progresaron. La mediana de tiempo hasta la recidiva fue de 8 meses (5,7-12,7) y de progresión 14 meses (P75: 12).

En lo que al análisis de las mutaciones estudiadas se refiere, 1 paciente (1,4%) presentó mutación en KRAS 12 y ninguno en KRAS 13. En el estudio de inestabilidad de microsatélites, 5 pacientes (6,8%) presentaron mutación en BAT 25, 4 (5,4%) en BAT26 y 6 (8,1%) en D2S123. Respecto al polimorfismo Arg72Pro del gen TP53, 50 pacientes (67,6%) fueron homocigotos mutados, 23 pacientes (31,1%) fueron heterocigotos mutados, y 1 paciente (1,4%), no presentaban la mutación.

Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de BAT26 MSI y el ser mujer ($p < 0,05$). Se observó una asociación estadísticamente significativa entre el estadio y la mutación del polimorfismo Arg72Pro TP53, siendo la mayor parte de tumores p T1 homocigotos o heterocigotos mutados, y los tumores pTa fueron en una mayor frecuencia heterocigotos mutados.

La SLR se asoció significativamente al número de RTUs previas, con una HR de 5,13 para los pacientes que habían sido sometidos a 3 o más RTUs (IC95%: 2,12-12,36) con respecto a los

que habían sido sometidos a menos de 3; y a la presencia de D2S123 MSI, con una HR de 5,44 para los pacientes que presentaban la mutación (IC95%: 1,83-16,16) con respecto a los que no.

En el análisis multivariante, encontramos diferencias estadísticamente significativas para mayor riesgo de recidiva para D2S123 MSI positivo (HR: 5,15; p: 0,004) y el número de RTUs previas mayor a 2 (HR: 5,07; p:0,00) ajustados al estadio y grado.

Se creó un modelo para discriminar qué pacientes sufrirán recidiva, siendo el índice de C de Harrell del 0,74 (p <0,001). Al ajustar el modelo al estadio, se observaron diferencias estadísticamente significativas para la presencia de D2123 MSI y los tumores papilares pTa (p<0,05).

CONCLUSIONES: La presencia de BAT26 MSI se asoció al sexo femenino de forma significativa. EL polimorfismo Arg72Pro se asoció al estadio tumoral. La presencia D2S123 y el número de RTUv previas mayor a 2 se asociaron de forma significativa con la SLR, ajustados para el estadio y el grado.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) are a heterogeneous group of tumors with different recurrence and progression rates. Mutations in codons 12 and 13 of the KRAS gene (oncogene), Arg72Pro polymorphism of the TP53 gene (tumor suppressor gene) and / or the instability of the microsatellite BAT 25, BAT 26 and D2S123 have been involved in bladder cancer genesis. These biomarkers could be a tool to predict long-term risks of disease recurrence and progression in individual patients.

OBJECTIVES:

1. To analyze the presence of mutations in codons 12 and 13 of the KRAS gene, the Arg72Pro polymorphism of the TP53 gene and the instability of microsatellites (MSI) BAT 25, BAT 26 and D2S123 in a series of patients diagnosed of NMIBT with intermediate or high risk for recurrence and progression.
2. Study its prognostic value for recurrence and progression.

MATERIAL AND METHODS: Prospective observational study. Between April 2012 and April 2013 , 74 consecutive patients diagnosed of NMIBC of intermediate and high risk for recurrence and / or progression according to EAU criteria were included to study aforementioned biomarkers. Data obtained from the genetic analyzes were collected and included in a database with the clinicopathological variables of interest. Cases diagnosed of other neoplasms were excluded.

The association between qualitative variables was evaluated with the Chi-square test or Fisher's exact test. Quantitative variables were compared with the Student t test (in comparisons of one variable with two categories) and the median variables with the

nonparametric test of the median. Kaplan-Meier method was used for the statistical analysis of the probability of survival. Statistical package SPSS 15.0.

RESULTS: 74 patients were included. Average age was 70.72 years (SD: 10.92). 61 patients were men (82.4%) and 13 were women (17.6%). Median follow-up was 46.81 months (Interquartile range: 33.55-61.65) and the average follow-up was 45.68 months (standard deviation: \pm 20.31). Twenty-five patients (33.8%) relapsed and 3 patients (4.1%) progressed. The median time to recurrence was 8 months (5.7-12.7) and median time to progression was 14 months (P75: 12).

One patient (1.4%) presented KRAS 12 mutation and none in KRAS 13. Regarding the Arg72Pro polymorphism of the TP53 gene, 50 patients (67.6%) were mutated homozygotes, 23 patients (31.1%) were mutated heterozygotes, and 1 patient (1.4%) was wild type. In the study of microsatellite instability, 5 patients (6.8%) presented BAT 25 MSI, 4 (5.4%) BAT26 MSI and 6 (8.1%) D2S123 MSI.

We found a statistically significant association between the presence of BAT26 MSI and female sex ($p < 0.05$). A statistically significant association was observed between the stage and the Arg72Pro TP53 polymorphism, with most of the T1 tumors being homozygous mutated.

The recurrence-free survival (RFS) was significantly associated with the number of previous transurethral resection of bladder (TURB), with an HR of 5.13 for patients who had undergone 3 or more TURBs (95% CI: 2.12-12.36) with respect to those who had undergone less than 3; and in the presence of D2S123 MSI, with an HR of 5.44 for patients who had the mutation (95% CI: 1.83-16.16) with respect to those who did not.

In the multivariate analysis, we found statistically significant differences for higher risk of recurrence for D2S123 MSI positive (HR: 5.15, p: 0.004) and the number of previous RTUs greater than 2 (HR: 5.07; p: 0.00)) adjusted to the stadium and grade.

A model was created to discriminate which patients will suffer relapse, being the Harrell C index of 0.74 (p <0.001). When adjusting the model to the stage, statistically significant differences were observed for the presence of D2123 MSI and papillary pTa tumors (p <0.05).

CONCLUSIONS: The presence of BAT26 MSI was significantly associated with the female sex. The Arg72Pro polymorphism was associated with the tumor stage. The presence of D2S123 and the number of previous TURVs greater than 2 were significantly associated with SLR, adjusted for the stage and grade.

INTRODUCCIÓN

Situación actual del cáncer de vejiga en el mundo

El cáncer de vejiga es el séptimo cáncer más frecuente en el mundo, siendo el carcinoma urotelial el subtipo más frecuente (más del 90%). Alrededor del 70-80% de pacientes son diagnosticados de tumores no músculo-infiltrantes y de bajo grado.

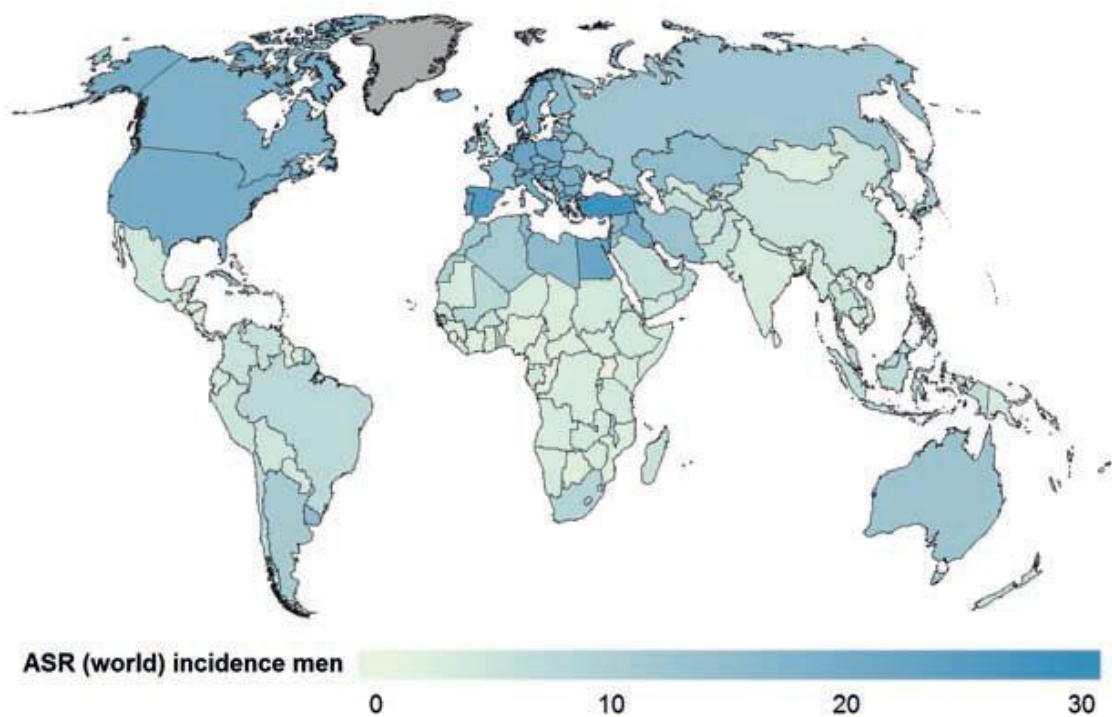
Según la Organización mundial de la salud (OMS) se estimaron 430000 nuevos casos y 165000 muertes para el año 2015, siendo la decimotercera causa de muerte por cáncer mundial.

La incidencia y las tasas de mortalidad son elevadas en Norteamérica, Europa, Norte de África, Oriente Medio, Australia y Nueva Zelanda. Estas cifras disminuyen en varios países de África y Asia y en algunos latinoamericanos.

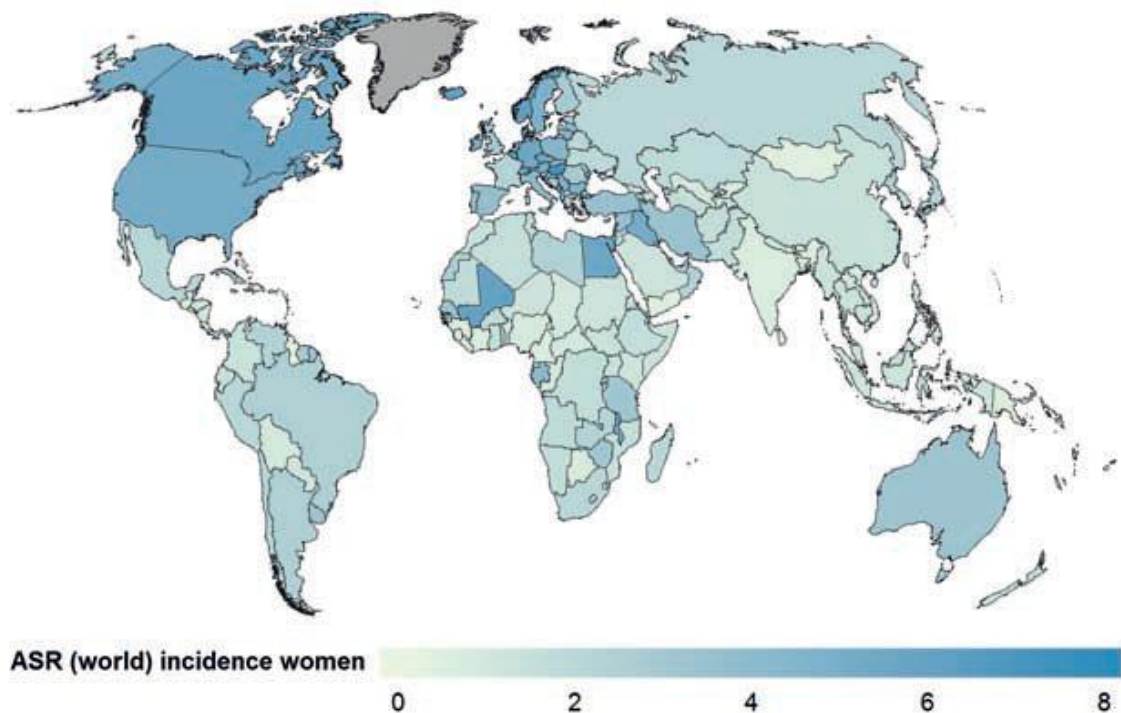
La incidencia varía hasta 10 veces entre las diferentes regiones geográficas, siendo el 72% de los nuevos casos diagnosticados en países con un nivel de desarrollo alto o muy alto. La incidencia y tasas de mortalidad son de 2 a 4 veces mayores en hombres que en mujeres.

Las tendencias en la incidencia son difíciles de interpretar al no tener información precisa en los diferentes registros. Aparentemente ha habido una disminución en la incidencia y mortalidad en los países desarrollados, pero se ha observado una tendencia ascendente en algunos países de Europa del Este y en algún país en desarrollo.

En los mapas 1 y 2 se muestran las distribuciones globales mundiales de cáncer vesical por sexos para el año 2012.



Mapa 1. Distribución global del cáncer vesical para el año 2012 ajustado por edad. Incidencia en hombres por 100000 habitantes. (Tomado de “World Cancer Report. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization; 2014”).



Mapa 2. Distribución global del cáncer vesical para el año 2012 ajustado por edad. Incidencia en mujeres por 100000 habitantes. (Tomado de “World Cancer Report. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization; 2014”).

Según datos del *Surveillance, Epidemiology and End Results Program* (SEER) se estimaron 76.900 casos y 16.390 muertes para el año 2016 en Estados Unidos. (Tabla 1)

La incidencia basándose en los datos del SEER fue de 20,1 por 100000 personas por año. La incidencia de mortalidad fue 4,4 por 100.000 personas por año, basándose en casos y muertes entre los años 2009 y 2013.

La prevalencia fue de 587.426 personas en Estados Unidos en 2013. En cuanto al riesgo de desarrollar cáncer de vejiga, basándose en datos de 2011-2013, aproximadamente 2,4 % de personas serán diagnosticados de cáncer de vejiga a lo largo de su vida. La edad media al diagnóstico es de 73 años.

La supervivencia a 5 años en pacientes que han sido diagnosticados es de 77,5%, entendiendo la limitación de este dato al provenir de estudios poblacionales, que no valen para predecir el resultado individual de un paciente.

El cáncer de vejiga representa el 4,6% de todos los nuevos casos de cáncer diagnosticados en Estados Unidos.(Tabla 1) (1)

Tabla 1. Estimación de nuevos casos y muertes para el año 2016

(Tomado de base de datos SEER. Disponible en:
<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html>)

	Common Types of Cancer	Estimated New Cases 2016	Estimated Deaths 2016
1.	Breast Cancer (Female)	246,660	40,450
2.	Lung and Bronchus Cancer	224,390	158,080
3.	Prostate Cancer	180,890	26,120
4.	Colon and Rectum Cancer	134,490	49,190
5.	Bladder Cancer	76,960	16,390
6.	Melanoma of the Skin	76,380	10,130
7.	Non-Hodgkin Lymphoma	72,580	20,150
8.	Thyroid Cancer	64,300	1,980
9.	Kidney and Renal Pelvis Cancer	62,700	14,240
10.	Leukemia	60,140	24,400

Situación del cáncer de vejiga en España

El cáncer de vejiga es el 5º en España en incidencia, por detrás de colon, próstata, pulmón y mama. Esta incidencia es similar a los países de su entorno. Debido a su menor mortalidad en relación con otros tumores, es el cuarto en prevalencia por detrás de próstata, mama e intestino grueso.

Según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) obtenidos a partir de Instituto Nacional de Estadística (INE) y por los grupos cooperativos EUROCARE (EUROCARE-5) y REDECAN (Red Española de Registros de Cáncer), así como los de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) de la OMS, a través de la página web EUCAN y GLOBOCAN, la incidencia global del cáncer de vejiga fue del 6,4% (13789 casos nuevos) en 2012. Al desglosar por sexos, la incidencia fue de 9,01% (11584 casos) en varones y de 2,53 % (2205 casos) en mujeres.

En nuestro país, el cáncer provocó 69000 muertes al año en hombres, de las cuales el 6,8% son debidas al cáncer de vejiga, y 42600 muertes al año en mujeres, de las cuales el porcentaje debido a cáncer vesical es inferior al 5% según datos del año 2012 (2).

Los tumores responsables del mayor número de fallecimientos en 2012 en España en la población general fueron el cáncer de pulmón (21.118 muertes) y el cáncer de colon (14.700 muertes), seguidos a una gran distancia del cáncer de mama (6.075 muertes), cáncer de páncreas (5.720 casos) y de próstata (5.481 muertes).

El cáncer de pulmón encabezó además en el año 2012 la mortalidad por tumores en varones (17.430 muertes), seguidos del cáncer de colon (8.742 muertes), próstata (5.481 muertes), vejiga (4.102 muertes) y estómago (3.335 fallecimientos), no así en mujeres en las que la mortalidad fue mucho menor. (3)

Podemos observar los valores de incidencia, mortalidad y prevalencia a 5 años en relación con otros tumores. (Tabla 2) (4)

Tabla 2. Incidencia, mortalidad y prevalencia a 5 años en población adulta estimadas para 2012 en España.

Tomado de Globocan 2012 (IARC).

Cancer	Incidencia			Mortalidad			5-year prevalencia		
	Total	(%)	ASR	Total	(%)	ASR	Total	(%)	Prop.
Labios, cavidad oral	4.098	1,9	4,7	1.117	1,1	1,2	11.811	2,0	29,8
Nasofaringe	350	0,2	0,5	188	0,2	0,2	909	0,2	2,3
Faringe, otras localizaciones	1.530	0,7	2,1	765	0,7	1,0	3.792	0,7	9,6
Esófago	2.090	1,0	2,5	1.728	1,7	1,9	2.238	0,4	5,7
Estómago	7.810	3,6	7,8	5.389	5,2	4,9	12.611	2,2	31,8
Colorrecto	32.240	15,0	33,1	14.700	14,3	12,3	89.705	15,4	226,3
Hígado	5.522	2,6	6,0	4.536	4,4	4,3	5.506	0,9	13,9
Vesícula biliar	2.002	0,9	1,7	1.174	1,1	0,9	1.905	0,3	4,8
Páncreas	6.367	3,0	6,3	5.720	5,6	5,5	3.437	0,6	8,7
Laringe	3.182	1,5	4,1	1.321	1,3	1,5	11.200	1,9	28,3
Pulmón	26.715	12,4	30,3	21.118	20,6	22,8	28.148	4,8	71,0
Melanoma	5.004	2,3	6,9	967	0,9	1,0	19.792	3,4	49,9
Kaposi sarcoma	316	0,1	0,5	24	0,0	0,0	880	0,2	2,2
Mama	25.215	11,7	67,3	6.075	5,9	11,9	104.210	17,9	516,2
Cérvix	2.511	1,2	7,8	848	0,8	2,1	8.867	1,5	43,9
Cuerpo del Útero	5.121	2,4	11,6	1.211	1,2	1,9	19.272	3,3	95,5
Ovario	3.236	1,5	7,7	1.878	1,8	3,7	7.925	1,4	39,3
Próstata	27.853	12,9	65,2	5.481	5,3	8,6	102.559	17,6	527,3
Testículo	823	0,4	3,5	42	0,0	0,1	3.242	0,6	16,7
Riñón	6.474	3,0	7,8	2.295	2,2	2,2	18.693	3,2	47,2
Vejiga	13.789	6,4	13,9	5.007	4,9	4,0	47.225	8,1	119,2
Sistema nervioso	3.717	1,7	5,1	2.668	2,6	3,3	3.187	0,5	8,0
Tiroides	2.059	1,0	3,4	286	0,3	0,3	8.097	1,4	20,4
Linfoma de Hodgkin	1.150	0,5	2,3	212	0,2	0,3	3.644	0,6	9,2
Linfoma no Hodgkin	6.130	2,8	7,5	2.337	2,3	2,2	16.342	2,8	41,2
Mieloma múltiple	2.420	1,1	2,3	1.675	1,6	1,4	5.730	1,0	14,5
Leucemia	5.190	2,4	6,5	3.212	3,1	3,0	11.040	1,9	27,9
Todos los tumores (excl. tumores cutáneos no melanoma)	215.534	100,0	249,1	102.762	100,0	98,1	581.688	100,0	1.467,6

Etiología

El factor de riesgo conocido más importante para el cáncer de vejiga es el tabaco (5). El riesgo de padecerlo es de 2 a 6 veces mayor para los fumadores que para los que nunca han fumado.

El tabaco contiene aminos aromáticas como el 4-aminobifenilo y la 2-naftilamina , y el negro en concreto, altos niveles de N-nitrosaminas y aminos aromáticas que duplica el riesgo respecto al tabaco rubio.

La exposición ocupacional a aminos aromáticas, hidrocarburos policíclicos aromáticos y los hidrocarburos clorados es el segundo factor de riesgo más importante, y existe evidencia que los productos químicos generados por la cloración del agua puede aumentar el riesgo. (6)

La inflamación crónica de la vejiga es también un importante factor de riesgo, especialmente para carcinomas escamosos. La infección crónica por el parásito *Schistosoma haematobium* que provoca la esquistosomiasis se ha visto asociada con el desarrollo de de cáncer de vejiga en países endémicos, aumentando el riesgo de 2 a 15 veces en infectados comparados con no infectados.

La irritación de la mucosa y la inflamación crónica que se produce por ejemplo en los portadores permanentes de sonda vesical puede causar metaplasia escamosa, displasia y eventualmente carcinoma escamoso.

Otros factores menos frecuentes serían: la contaminación del agua con arsénico; los polimorfismos de NAT2 y GSTM1, ambos genes metabólicos, muestran los hallazgos más consistentes, ya que el fenotipo acetilador lento de NAT2 aumenta 2-3 veces el riesgo de padecer cáncer en fumadores, y 1,3-1,5 en pacientes con inactivación de uno de los dos alelos de GSTM1 (6); la exposición a radiaciones ionizantes incrementa el riesgo y la ciclofosfamida y la pioglitazona presentan una asociación débil. (7)

Aunque los antecedentes familiares parece que tiene poca influencia, estudios recientes del genoma han identificado múltiples regiones en las que las alteraciones están ligadas al riesgo de sufrir cáncer de vejiga (8). Las dos vías principales de degradación son la vía de la N-

acetilación y la de la N-hidroxilación. Los productos de la primera vía no son carcinógenos mientras que los productos de la segunda si lo son. La enzima clave en la primera vía es la N-acetiltransferasa 2 (NAT2), principal enzima acetiladora del urotelio, y existen dos genotipos para esta enzima, que resultan en dos tipos de sujetos, los “acetiladores lentos” y los “acetiladores rápidos”. Como los compuestos acetilados son menos carcinogénicos, los sujetos acetiladores rápidos serán menos sensibles a la exposición al humo del tabaco.

Anatomía Patológica

La vejiga tiene 3 capas: urotelio, lámina propia y detrusor o muscular propia.

El urotelio es la capa donde se desarrolla el cáncer urotelial, que es el subtipo más frecuente de cáncer vesical.

El elemento fundamental en la evaluación del carcinoma urotelial vesical es reconocer la presencia y la extensión de la invasión o no de la muscular propia vesical, que cambia el diagnóstico de no músculo invasivo a músculo-invasivo. Figura 1.

En cuanto al grado, se diferencian los tumores de bajo grado, que serían aquellos con mínima atipia y los de alto grado, en los que existe un mayor nivel de cambios anaplásicos.

La clasificación utilizada para su estadiaje es el TNM (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación TNM de la Union International Contre le Cancer (UICC), actualizada en 2009. 7ª edición. (9)

T (tumor primario)	
Tx	El tumor no puede ser demostrado
T0	Sin evidencia de tumor primario
Ta	Carcinoma papilar no invasivo
Tis	Carcinoma in situ
T1	El tumor invade el tejido conectivo subepitelial
T2	El tumor invade el músculo
T2a	Invade la parte superficial del músculo (mitad interna)
T2b	Invade la parte profunda del músculo (mitad externa)
T3	El tumor invade el tejido perivesical
T3a	Microscópicamente
T3b	Macroscópicamente (masa extravesical)
T4	El tumor invade cualquiera de los siguiente órganos: próstata, útero, vagina, pared abdominal
T4a	Invade próstata, útero o vagina
T4b	Invade la pared pélvica o abdominal
N (ganglios linfáticos)	
Nx	La afectación de los ganglios linfáticos regionales no puede ser demostrada
N0	No existen metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en un único ganglio de 2 cm o menos en su eje largo
N2	Metástasis en un único ganglio de mayor de 2 cm pero no mayor de 5 cm en su eje largo, o múltiples ganglios linfáticos, ninguno mayor de 5cm en su eje largo

N3	Metástasis en un ganglio linfático mayor de 5cm en su eje largo
M (metástasis a distancia)	
Mx	Las metástasis a distancia no pueden ser demostradas
M0	Sin evidencia de metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

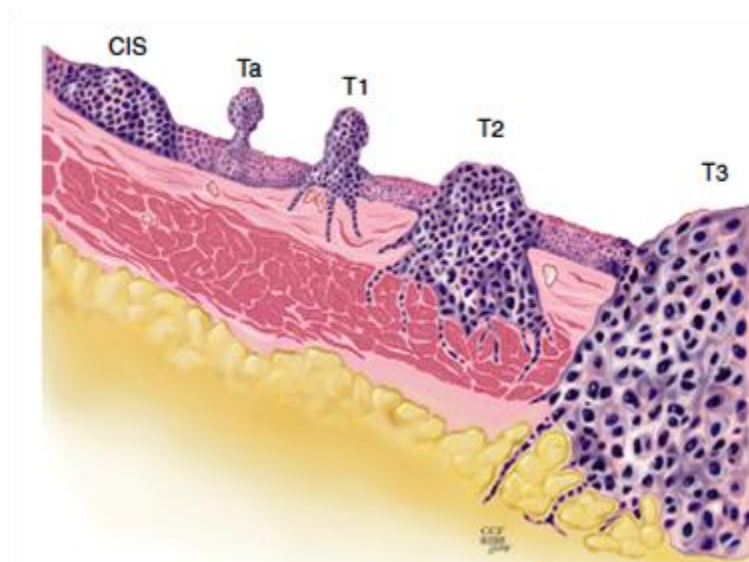


Figura 1. Estadios tumorales. Tomada de “Urology”, Campbell y Walsh, 10ª edición. El carcinoma in situ es una lesión de alto grado, plana y confinada al urotelio. Los tumores papilares confinados al urotelio son los Ta. El T1 invade la lámina propia. El T2 la muscular propia. El T3 el tejido adiposo perivesical.

Los tumores no invasivos están restringidos a la capa de células uroteliales y no penetran en la capa muscular propia propia.

Dentro de los tumores que no invaden la capa muscular que son el papilar (pTa), el carcinoma in situ (cis) y el que invade la lámina propia (pT1). El estadio pTa hace referencia a un tumor papilar confinado al urotelio; el cis es una lesión plana confinada al urotelio; y el T1, es un tumor que invade la lámina propia.

En el año 2004, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) publicaron una nueva clasificación histológica del carcinoma urotelial que estratifica de forma diferente los tumores respecto a la Clasificación de la OMS de 1973. (10) (11). Figura 2.

El valor pronóstico de ambas clasificaciones ha sido confirmado, gracias a la estandarización de los grados al definir unas características morfológicas para cada uno de ellos (12). Figura 3.

1973 WHO grading
<i>Urothelial papilloma</i>
Grade 1: well differentiated
Grade 2: moderately differentiated
Grade 3: poorly differentiated
2004 WHO grading system [papillary lesions]
<i>Urothelial papilloma (completely benign lesion)</i>
Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUNLMP)
Low-grade (LG) papillary urothelial carcinoma
High-grade (HG) papillary urothelial carcinoma

Figura 2. Diferencias entre el sistema clasificación de la OMS de 1973 y 2004.

En la Clasificación de 1973 los tumores grado 1 han sido reasignados a neoplasias uroteliales papilares de bajo potencial maligno (papillary urothelial neoplasm of low malignant potential-PUNLMP) y bajo grado (low grade-LG) en la de 2004. Los carcinomas grado 2 a bajo grado (LG) y a alto grado (HG). Todos los grado 3 han sido reasignados a HG.

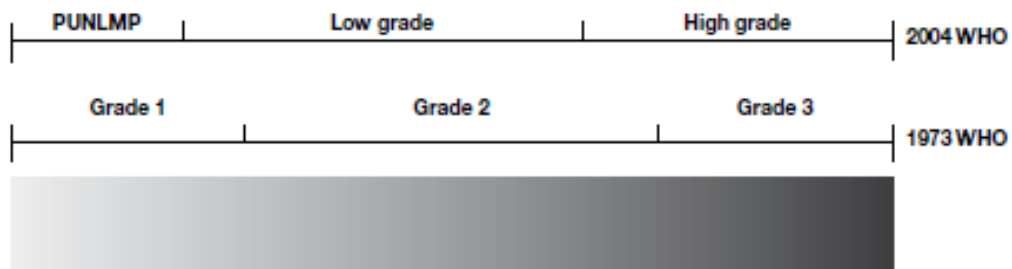


Figura 3. Correspondencia entre grados tumorales entre la clasificación de la OMS de 1973 y 2004.

Diagnóstico

Los síntomas que desencadena el diagnóstico del cáncer vesical de células transicionales (CCT) son muy variables e inespecíficos tales como pueden ser la polaquiuria, nicturia, disuria o urgencia miccional.

El signo más frecuentemente encontrado es la hematuria monosintomática. La incidencia de TVNMI es de hasta el 19% en pacientes que presentan hematuria macroscópica y del 0,19% al 21% en los pacientes que presentan hematuria microscópica. (13) (14)

La principal prueba diagnóstica es la cistoscopia flexible con luz blanca. Su sensibilidad es excelente para el diagnóstico de tumores papilares pero baja para el cis. Para la cistoscopia con luz blanca la sensibilidad global oscila entre el 87% y del 100%, y la especificidad entre el 85% y el 82%.

En cuanto a las pruebas de imagen, la ecografía permite detectar masas renales, hidronefrosis y visualizar masas intravesicales, pudiendo sustituir a la cistoscopia para su diagnóstico únicamente cuando es positiva.

La citología de orina es un test simple, no invasivo y relativamente barato para detectar carcinoma urotelial (15), cuya precisión es observador-dependiente (22). Tiene alta especificidad sobre todo para el cis y los tumores de alto grado (84%) (16). Sin embargo tiene baja sensibilidad para los tumores de bajo grado.

Es útil junto con la cistoscopia para diagnosticar tumores de alto grado/cis. Su negatividad no excluye la presencia de tumor.

Los factores que influyen en su baja sensibilidad son la escasa atipia de los tumores de bajo grado, el ambiente inflamatorio, la instrumentación del tracto urinario, litiasis, cambios reactivos y los cambios post tratamiento con Bacilo de Calmette y Guérin (BCG).

La incidencia de tumores del tracto urinario superior (TUS) concomitantes es baja (1,8%) pero aumenta al 7,5% para los tumores localizados en el trigono, múltiples y de alto riesgo (17) (18) (19). Por ello la necesidad de realizar una prueba del tracto urinario superior a todos los pacientes es motivo de debate. Entre ellas, la Urografía-Tomografía axial computerizada-Urografía (Uro-TAC), que es la más utilizada actualmente en el diagnóstico de tumores papilares en el tracto urinario superior. La urografía intravenosa (UIV) puede ser una alternativa cuando el Uro-TAC no está disponible.

Tratamiento quirúrgico endoscópico

La resección transuretral vesical (RTUv) bajo anestesia regional o general es el paso inicial en el tratamiento. Tiene dos objetivos: resecar todo el tejido tumoral visible y proveer al anatomopatólogo de material para su examen y determinar el estadio y el grado.

La exploración bimanual de la vejiga debe practicarse bajo anestesia, el que esté fija o se palpe tumor después de la resección sugiere que el tumor está localmente avanzado.

Después de resecar todo el tumor visible, se debe resecar o tomar biopsia fría de la base del tumor para diagnosticar la ausencia o presencia de infiltración muscular.

La resección completa y correcta es fundamental para el buen pronóstico.

Existe un riesgo de tumor residual después de la primera RTUv no despreciable (20) y se ha visto que la ausencia de detrusor en la muestra se asocia con un mayor riesgo de enfermedad residual, recurrencia precoz y subestadiaje tumoral. (21) (22)

La enfermedad persistente se ha observado hasta en un 33-55% de pacientes después de resecar un tumor T1 y hasta un 41,4% en tumores TaG3. (23) (24) (25) (26) (27)

El riesgo de infraestadiaje también existe. La probabilidad de que un tumor T1 en una primera resección, sea diagnosticado como T2 en la segunda resección varía entre el 4 y el 25%, y alcanza hasta el 45% en los tumores en los que no había músculo en la primera resección. (28)

Además, se ha demostrado que una segunda RTUv puede incrementar la supervivencia libre de recurrencia (23) (29), mejora el resultado del tratamiento con BCG (30), y aporta información pronóstica si es positiva. (31) (32)

Por todo ello, las indicaciones para realizar una segunda RTUv son una RTUv incompleta, ausencia de capa muscular en la muestra de la primera resección (exceptuando los tumores TaG1 y cis primario), en todos los tumores T1 y en todos los tumores de alto grado (excepto el cis primario).

Riesgo de recurrencia y progresión

El riesgo global de recurrencia para los TVNMI es de entre el 50-70% y el riesgo global de progresión es del 10-20%, sin embargo como veremos, es muy variable dependiendo de las características del tumor.

Para intentar predecir el riesgo de recurrencia y progresión la European Organization for Research and Cancer Trials (EORTC) ha creado unas tablas de riesgos, en base al análisis de 2596 pacientes que presentaban tumores pTa/pT1, basadas en 6 factores clínicos y patológicos: número de tumores, tamaño, recurrencias previas, categoría T, presencia de cis y grado.

El 78% de los pacientes recibió tratamiento intravesical, la mayoría quimioterapia. Sin embargo, ninguno fue sometido a una segunda RTUv ni recibió BCG de mantenimiento.

En la tabla 4 se reflejan las variables y el peso de cada una para la recurrencia y progresión.

En la tabla 5 la probabilidad de recurrencia y progresión para de acuerdo al score obtenido en la tabla 4.

Tabla 4. Variables para calcular riesgo de recurrencia y progresión y peso específico de cada una. Tomado de EAU Guidelines on Non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1 and cis) 2016.

Factor	Recurrence	Progression
Number of tumours		
Single	0	0
2-7	3	3
≥ 8	6	3
Tumour diameter		
< 3 cm	0	0
≥ 3	3	3
Prior recurrence rate		
Primary	0	0
≤ 1 recurrence/year	2	2
> 1 recurrence/year	4	2
Category		
Ta	0	0
T1	1	4
Concurrent CIS		
No	0	0
Yes	1	6
Grade		
G1	0	0
G2	1	0
G3	2	5
Total Score	0-17	0-23

En la tabla 5 se reflejan el total de scores estratificados en 4 categorías que refleja las probabilidades de recurrencia y progresión a 1 y 5 años. (33)

Tabla 5. Probabilidad de recurrencia y progresión de acuerdo al score total. Tomado de EAU Guidelines on Non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1 and cis) 2016.

Recurrence score	Probability of recurrence at 1 year		Probability of recurrence at 5 years	
	%	(95% CI)	%	(95% CI)
0	15	(10-19)	31	(24-37)
1-4	24	(21-26)	46	(42-49)
5-9	38	(35-41)	62	(58-65)
10-17	61	(55-67)	78	(73-84)

Progression score	Probability of progression at 1 year		Probability of progression at 5 years	
	%	(95% CI)	%	(95% CI)
0	0.2	(0-0.7)	0.8	(0-1.7)
2-6	1	(0.4-1.6)	6	(5-8)
7-13	5	(4-7)	17	(14-20)
14-23	17	(10-24)	45	(35-55)

El Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico (CUETO) ha creado un modelo para predecir recurrencia y progresión en pacientes tratados con BCG basado en 7 factores pronósticos: sexo, edad, recurrencia previa, número de tumores, estadio T, cis asociado y grado tumoral. Para la recurrencia el riesgo con estas tablas es menor que con las de la EORTC y para la progresión es sólo menor para el alto riesgo (34). Este menor riesgo puede ser atribuido a la mayor eficacia de la BCG. El valor pronóstico de las tablas del grupo CUETO ha sido confirmado en trabajos con otras poblaciones independientes y con seguimiento a largo plazo, (35) (36).

En un trabajo con 1812 pacientes de riesgo intermedio y alto sin cis asociado que habían recibido instilaciones de BCG entre 1 y 3 años, la EORTC encontró que la recurrencia previa y el número de tumores eran los factores de pronóstico más importantes para la recurrencia; el estadio y el grado los factores pronósticos más importantes para la progresión y la supervivencia cáncer específica; y la edad y el grado los factores pronósticos más importantes para la supervivencia global. Con estos datos se diseñaron nuevas tablas para pacientes tratados con BCG. (37)

Basándose en estos datos la Asociación Europea de Urología recomienda estratificar a los pacientes en 3 grupos (Tabla 6) para su correcto tratamiento (Tabla 7)

Tabla 6. Clasificación según los grupos de riesgo. Tomado de EAU Guidelines on Non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1 and cis) 2016.

Risk group stratification	Characteristics
Low-risk tumours	Primary, solitary, Ta, G1* (PUNLMP, LG), < 3 cm, no CIS
Intermediate-risk tumours	All tumours not defined in the two adjacent categories (between the category of low- and high-risk).
High-risk tumours	Any of the following: <ul style="list-style-type: none"> • T1 tumour • G3** (HG) tumour • CIS • Multiple and recurrent and large (> 3 cm) Ta, G1G2 tumours (all conditions must be presented in this point)*

*El bajo grado es una mezcla de G1 y G2

**El alto grado es una mezcla de algunos G2 y G3

CIS: carcinoma in situ; HG: alto grado; LG: bajo grado; PUNLMP: neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno.

Tabla 7. Recomendaciones de tratamiento de acuerdo a la estratificación por riesgos.

Risk category	Definition	Treatment recommendation
Low-risk tumours	Primary, solitary, Ta, G1/PUNLMP, LG, < 3 cm, no CIS	One immediate instillation of intravesical chemotherapy after TURB.
Intermediate-risk tumours	All cases between categories of low and high risk	In patients with previous low recurrence rate (less than or equal to one recurrence per year) and expected EORTC recurrence score < 5, one immediate instillation of intravesical chemotherapy after TURB. In all patients either 1-year full-dose BCG treatment (induction plus 3-weekly instillations at 3,6 and 12 months), or instillations of chemotherapy (the optimal schedule is not known) for a maximum of 1 year.
High-risk tumours	Any of the following: <ul style="list-style-type: none"> • T1 tumours; • HG/G3 tumours; • CIS; • Multiple and recurrent and large (> 3 cm) Ta G1G2 tumours (all these conditions must be presented). 	Intravesical full-dose BCG instillations for 1-3 years or cystectomy (in highest-risk tumours - see below).
	Subgroup of highest-risk tumours	
	T1G3/HG associated with concurrent bladder CIS, multiple and/or large T1G3/HG and/or recurrent T1G3/HG, T1G3/HG with CIS in the prostatic urethra, unusual histology of urothelial carcinoma, LVI (see Sections 4.6 and 6.2).	Radical cystectomy should be considered, in those who refuse intravesical full-dose BCG instillations for 1-3 years.
	BCG failures.	Radical cystectomy is recommended.

BCG: bacilo de Calmette y Guérin; CIS: carcinoma in situ; LG: bajo grado; HG: alto grado;

LVI: invasión linfocascular; TURB: resección transuretral de vejiga.

Tomado de EAU Guidelines on Non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1 and cis) 2016.

Seguimiento

La estrategia de seguimiento del TVNMI debe adaptarse al riesgo de recurrencia y progresión, realizándose revisiones mediante cistoscopia y estudios del tracto urinario superior a unos intervalos definidos adaptados a las características de cada grupo.

Siguiendo las recomendaciones de la EAU, la primera cistoscopia después de la RTUv debe realizarse a los 3 meses ya que es un factor pronóstico importante para la recidiva/progresión (38) (39) (40).

En tumores de bajo riesgo el riesgo de recurrencia a 5 años es muy bajo (39) pero en los tumores de riesgo intermedio y alto las recurrencias a 10 años es mayor, alcanzando el 30% (41).

Además, el riesgo de tumores en el tracto urinario superior aumenta hasta el 41% en los tumores múltiples y de alto riesgo. Por otra parte, debido a que el cis es un tumor no visible, los pacientes que son tratados por padecerlo, necesitan de biopsias vesicales en su seguimiento.

Por lo tanto las recomendaciones de la EAU son:

- Tumores de bajo riesgo: cistoscopia a los tres meses. Si es negativa, cistoscopia a los 9 meses y anualmente a partir de entonces hasta los 5 años.
- En los pacientes de alto riesgo se realizará citología urinaria y cistoscopia cada 3 meses hasta los dos años, y semestralmente hasta los 5 años. A partir del 5º año ,anualmente.
- Los de riesgo intermedio adaptarán un esquema con cistoscopia y citologías que mejor se adapte a los dos descritos previamente según su riesgo.
- Se realizará prueba de imagen del tracto urinario superior anualmente (Uro-TAC) en los tumores de alto riesgo.

- Se realizarán biopsias vesicales múltiples en los pacientes con diagnóstico de cis, después de terminar el tratamiento intravesical. Asimismo se realizarán en aquellos pacientes con citologías positivas y cistoscopia negativa.

Importancia del problema

Como ya hemos visto, el carcinoma transicional de vejiga se divide en dos grupos: musculoinfiltrantes (15-20%) que precisan de cirugía radical cuando son diagnosticados en una fase localizada y los tumores vesicales no-músculo invasivos (TVNMI) que representan el 80% restante y que son tratables en la mayoría de los casos mediante resección transuretral vesical (RTUv) asociada o no a quimioterapia o inmunoterapia intravesical en función del riesgo de recidiva y/o progresión.

Debido a estos riesgos, requieren realizar un estricto seguimiento con cistoscopia, citologías y estudios del tracto urinario superior en determinados casos (42).

Aunque la cistoscopia es considerada el gold-standard en el diagnóstico y seguimiento del TVNMI, es un método invasivo y además puede pasar por alto los tumores planos como el carcinoma in situ.

Las citologías de orina tienen una media de sensibilidad del 35% y una especificidad del 94%, aunque estas cifras mejoran en los tumores de alto grado, su limitación fundamental es la baja sensibilidad en tumores de bajo grado.(43)

Los TVNMI representan un trastorno en la que una estrategia diagnóstico-terapéutica adaptada al riesgo de recidiva y/o progresión tiene una importancia fundamental.

Estas limitaciones junto con el carácter invasivo de la cistoscopia hace muy interesante la investigación en métodos diagnósticos no invasivos.

El aumento de los conocimientos en biología molecular ha facilitado el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y de seguimiento.

La idea de marcador tumoral surge como consecuencia de la necesidad clínica de poder contar con indicadores biológicos de la existencia de un cáncer y que a su vez, puedan ser utilizados durante el seguimiento para diagnosticar recidiva y/o progresión. El marcador tumoral ideal debería reunir las siguientes características: ser producido exclusivamente por tejido maligno, ser fácilmente medible y reproducible, ser capaz de detectar una mínima cantidad de tumor, ser económico y tener alta sensibilidad y especificidad. (44) (45)

Los cambios moleculares en el carcinoma urotelial se pueden clasificar en 3 grupos:

- 1) alteraciones cromosómicas que inician el proceso carcinogénico
- 2) proliferación tumoral, ocasionada por la pérdida de los elementos reguladores del ciclo celular (oncogenes y genes supresores de tumores)
- 3) metástasis, en el que se pierden las adhesiones celulares y se activa la angiogénesis.

Como resultado existen diferentes biomarcadores que pueden aplicarse en las diferentes fases del desarrollo. (46)

No obstante, a pesar los diferentes biomarcadores que han sido propuestos tanto para diagnóstico como para pronóstico, a día de hoy los únicos factores demostrados que influyen en el pronóstico siguen siendo clínicos y patológicos, a saber, número de tumores, tamaño, recurrencias previas, categoría T, presencia de cis y grado.

Por ello, el descubrimiento de biomarcadores que nos permitiesen etiquetar el riesgo que presenta un tumor en la primera RTUv, permitiría una estrategia de seguimiento más precisa con las ventajas que ello conlleva para el paciente.

Biología molecular

La vida de una célula es el periodo de tiempo transcurrido desde su formación hasta su destrucción.

Todas las células se renuevan continuamente en un proceso de “recambio celular”. En condiciones fisiológicas, se requiere una estricta regulación genética para mantener la homeostasis o equilibrio celular de forma adecuada a las necesidades de cada tejido mediante la contraposición de dos procesos:

- La formación por mitosis de nuevas células hijas, determina la tasa de proliferación. Este proceso, se asocia además a un proceso de diferenciación celular, particular para cada tejido o estado de desarrollo.

- La apoptosis, o muerte celular programada, es un mecanismo fisiológico de eliminación de células al final de su vida activa, como parte del recambio celular necesario para contrarrestar la producción continua por división celular. Igualmente, interviene en la formación de tejidos, en la morfogénesis y en la eliminación de las células con daño genético.

La alteración de este equilibrio en condiciones patológicas da lugar a un crecimiento descontrolado, que bien puede deberse a una excesiva proliferación, a una reducida apoptosis, o bien a ambas. Este desequilibrio parece ser el origen del desarrollo neoplásico.

El ciclo celular

El ciclo celular es un proceso cuya finalidad es la de producir dos células hijas de idénticas características. Está dividido en varias fases en cada una de las cuales tienen lugar una serie de acontecimientos específicos fundamentales para la continuación del proceso (47)(figura 4):

- Fase G1: Es la primera fase de la división celular. En ella, la célula evalúa su propia masa celular y su entorno, y si los encuentra propicios para la división, sintetizará todas las proteínas necesarias para la nueva síntesis de DNA. Suele tener una duración de 6 a 12 horas.
- Fase S: La fase de síntesis de DNA, se conoce como fase S, tiene una duración de 6 a 8 horas, y en ella se produce una duplicación completa del material genético.
- Fase G2: Es la fase de revisión, en la que se comprueba que la duplicación del DNA sea correcta. Una vez sucedida la duplicación del material genético, la célula la comprueba, y repara los posibles errores durante un periodo que dura unas 3-4 horas; una vez que la secuencia de DNA no muestra anomalías, pasa a la fase final.
- Fase M: En esta fase, cuya duración aproximada es de una hora, se produce la duplicación celular, y dará lugar a dos células hijas. En ella tiene lugar la condensación de los cromosomas, la rotura de la membrana nuclear, y la separación de los cromátides de cada cromosoma que se dispersarán y se agruparán en cada polo celular para, tras la formación de nuevas membranas nucleares, producirse la división citoplasmática.
- Fase G0: Una vez dividida una célula, ésta entra en una fase de reposo denominada G0.

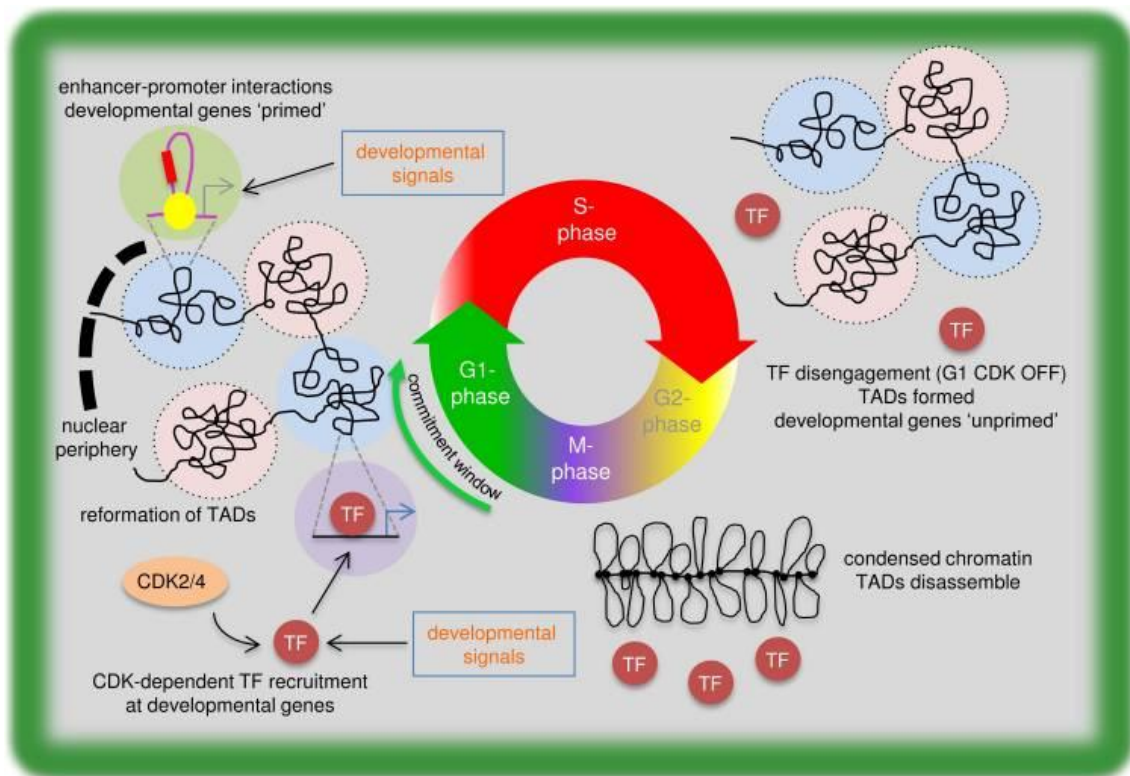


Figura 4. Ciclo celular. Tomada de "Trends cell biology" 2015 Oct; 25 (10) : 592-600.

El ciclo celular está regulado en todas sus fases mediante mecanismos estrictos a nivel de determinados puntos de control que impiden iniciar una fase sin que se haya completado la fase previa, o si ésta se ha realizado de modo defectuoso. La serie de productos que favorecen o inhiben el paso de una determinada fase a la siguiente son los llamados factores de activación o de inhibición celulares, y están controlados por un grupo de genes denominados genes del ciclo de división celular (Cdc).

Oncogen KRAS

La familia de genes RAS (HRAS, KRAS y NRAS) son miembros de una familia de *GTP binding proteins* de bajo peso molecular que actúan como transductores de señales dependientes de los receptores de la tirosin kinasa entre los que se incluye el factor de crecimiento fibroblástico.

Estos tres miembros están muy estrechamente relacionados, con un 85% de coincidencia en sus secuencias de aminoácidos. Las proteínas Ras son reguladas por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) que promueven la disociación del GDP y la unión a GTP, y las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) que estimulan la actividad GTPasa intrínseca de Ras para desactivar la señalización. Las proteínas KRAS se expresan en casi todos los tipos de células. Estudios con ratones modificados por ingeniería genética para que uno o más de sus genes estén inactivados han demostrado que HRAS y NRAS, no son necesarios para el desarrollo normal en el ratón, mientras que KRAS es esencial (48).

Esto podría reflejar la expresión más ubicua de KRAS (49). La función de RAS aberrante se asocia con trastornos de desarrollo hiperproliferativos y cánceres, y es una de las alteraciones oncogénicas más frecuentes en tumores humanos (50). Se asocia con una única mutación típicamente en los codones 12, 13 o 61. Estos cambios alteran la actividad intrínseca de la GTPasa y confieren resistencia a GAPs, causando así proteínas RAS mutadas en la forma activa unida a GTP (51). Esto conlleva que mientras en la forma KRAS *wild type* después de la activación del receptor EGFR sea activa durante un periodo corto de tiempo a través de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK); en la forma mutada, esté continuamente activada haciéndose independiente de los receptores de la tirosin kinasa.

Entre los genes RAS, KRAS es la isoforma mutada más frecuentemente. Se encontró que estaba presente en el 22% de todos los tumores analizados (52). 80% de las mutaciones KRAS se producen en el codón 12 (en el exón 1), mientras que muy pocas mutaciones se observan en el codón 61 (53). En el cáncer metastásico colorrectal aparece la mutación entre el 30 y el 50% de

los casos, siendo en el tratamiento con anticuerpos monoclonales (cetuximab o panitumumab) no efectivo para mejorar la supervivencia de estos pacientes (54), pudiendo evitar mediante su análisis toxicidad y costes de estos tratamientos. En el cáncer vesical está presenta en frecuencias de hasta el 11% (55) (56) y su utilidad es desconocida. Figura 5.

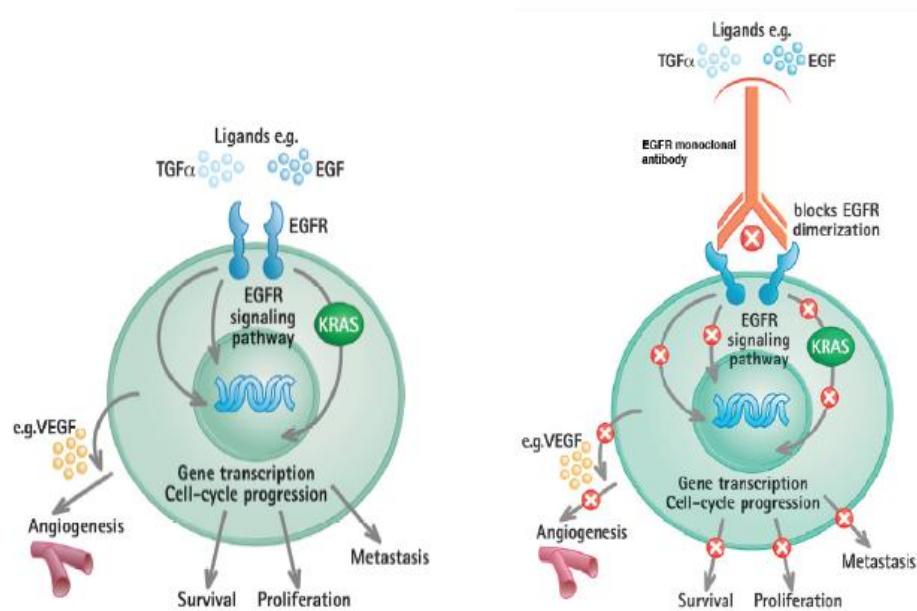


Figura 5. Ruta del factor de crecimiento fibroblástico. Izquierda: ruta del factor de crecimiento fibroblástico. Derecha: inhibición de la ruta mediante anticuerpos monoclonales.

Genes supresores: p53

El gen supresor *p53*, codifica la proteína p53, que actúa a nivel de la transcripción y de la traslación, revisando la correcta secuencia de DNA antes de replicarse. Este gen está controlado por otro gen inactivador, el *MDM2*, que codifica la proteína p90. La proteína p53 actúa sobre la proteína p21, que inhibe la fosforilación de la pRb, y con este mecanismo, el gen *p53* permite la reparación del DNA anómalo (a través de múltiples genes reparadores como

MLH1 y *MLH2*, entre otros) (57) y, en caso contrario, se provoca la detención del ciclo celular y provoca la entrada de la célula en G0, o bien su muerte por apoptosis (58).

Se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1), tiene 20 Kb y presenta 11 exones. Codifica la expresión de una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos y 53 Kda que regula el paso de G1 a S en el ciclo celular por acción sobre el complejo de iniciación de la replicación del DNA o por activación de los genes de paso de G1 a S. La falta de *p53* favorece el mantenimiento indefinido del ciclo celular.

La proteína *p53* es una proteína tetramérica constituida por cuatro subunidades, cada una de ellas de 393 aa, y tiene la típica estructura de un factor de transcripción: un dominio N-terminal (aa 1- 43) de activación transcripcional, un dominio ligante de DNA (aa 110-286), un dominio de oligomerización (aa 326-355) responsable de la oligomerización de tetrámeros, y otro carboxiterminal (aa 363-393) más.

Los trabajos de algunos grupos de investigación (59) (60) (61) sugieren que la proteína *p53* debe unirse a un receptor nuclear para, a través de diferentes mecanismos, ejercer sus acciones, entre las cuales destacan el control del ciclo celular, la reparación del DNA, la senescencia celular, la apoptosis, y la angiogénesis .

La proteína *p53* nativa tiene una vida media muy corta (entre 15 y 20 minutos) y se halla en cantidades muy pequeñas en las células normales. Las alteraciones en el gen *p53* inducen una proteína con una conformación más estable que la proteína normal, lo cual implica un aumento de su vida media y su acúmulo en el citoplasma y núcleo celular. Es este hecho lo que permite su detección y su cuantificación. Dicha proteína es incapaz de realizar su función de reparación de los daños producidos en el DNA por lo que se reduce la actividad transcripcional

de modo parcial o completo y se impide el control de la proliferación y la muerte celular programada, convirtiéndola en una célula de crecimiento incontrolado.

Las alteraciones genéticas que se observan más frecuentemente en *p53* son las mutaciones puntuales. La mayor parte de ellas (más del 90%) están situadas en el dominio ligante de DNA187, y concretamente entre los residuos aminoácidos 130 a 286; principalmente en cuatro regiones: los residuos 117-142, 171-181, 234-258 y 270-286, y aunque relativamente infrecuentes, las mutaciones en el dominio de oligomerización (4%) impiden la unión al DNA, y por este otro mecanismo, promueven la proliferación de la célula tumoral (62).

La mutación Arg72Pro ocurre en un lugar particularmente importante para su función apoptótica (63).

A este respecto, los estudios realizados en el carcinoma de colon han encontrado que un 75-80% de los mismos muestra una alteración en ambos alelos del gen *p53*, y se han visto alteraciones genéticas similares en cánceres de pulmón, endometrio, mama, riñón, próstata y vejiga (64) (65) (66). La frecuencia de esta mutación en el cáncer vesical es de en torno al 25-50% (67) (68) (69) (70). Existen estudios que han demostrado su valor pronóstico para este tumor (71) (72) (73) (74).

Inestabilidad de microsatélites

En el genoma humano, existen secuencias repetitivas de DNA (usualmente de 1 a 4 bases de longitud), que se denominan secuencias de microsatélites. Estas secuencias varían mucho de unos individuos a otros, pero son idénticas en todas las células del mismo individuo. Cuando las células muestran errores de reparación del DNA, aparecen contracciones o expansiones de

estas repeticiones que van a dar lugar a alelos no parejos en las células normales del mismo paciente. Este fenómeno se denomina inestabilidad de microsatélites.

Los síndromes de inestabilidad cromosómica se caracterizan porque los individuos no reparan eficientemente el daño o errores que se acumulan en el DNA a lo largo de la vida celular. Entre los síndromes asociados a inestabilidad cromosómica más conocidos se encuentran los genes *XP* (xeroderma pigmentosa), *ATM* (ataxia telangiectasia) y *BLM* (síndrome de Bloom).

Existen dos grupos de inestabilidad de microsatélites -*microsatellite instability*- (*MSI*) en el cáncer, los típicos del cáncer de colon hereditario no polipósico (*hereditary nonpolyposis colon cancer- HNPCC*) que son debidos a una deficiente reparación del DNA y son una repetición de mono y dinucleótidos como son el caso de BAT 25, BAT26 y D2S123 (75) y que se hallan mutados en el cáncer vesical en una frecuencia de entre el 1% y el 44%(76) (77) (78) y los *Elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides* (EMAST), son una variante de MSI, que se ha descrito en diferentes neoplasias, sobre todo de aquellos órganos que estén directamente expuestos a carcinógenos como la vejiga(79).

Alteraciones genéticas del carcinoma urotelial

Los carcinomas uroteliales papilares no invasivos representan el 70-80% de todos los tumores vesicales. Se caracterizan por un crecimiento papilar y células con moderada atipia. Típicamente presentan delecciones totales o parciales del cromosoma 9 así como mutaciones de receptor de crecimiento FGFR3, que codifica para el receptor de crecimiento fibroblástico 3, y la inactivación de múltiples genes supresores de en el cromosoma 9, presentando una correlación inversa con el estadio tumoral y el grado. Las mutaciones de FGFR3 están

presentes en más del 60% de los tumores de bajo grado, no invasivos, 35% en los de alto grado no invasivos, 25% de los pT1 y 16 % de los pT2. (80) (81) (82)

La pérdida de cromosoma 9 ocurre en el 50% de los tumores, siendo vistas estas alteraciones como un fenómeno fundamental en el desarrollo del cáncer de vejiga. Probablemente múltiples genes supresores de tumores en el brazo corto y en el brazo largo sean inactivados por un evento genético.

El patrón de deleciones y amplificaciones encontrándose en el cis y los tumores de alto grado son similares al de los tumores invasivos. (83). Figura 6.

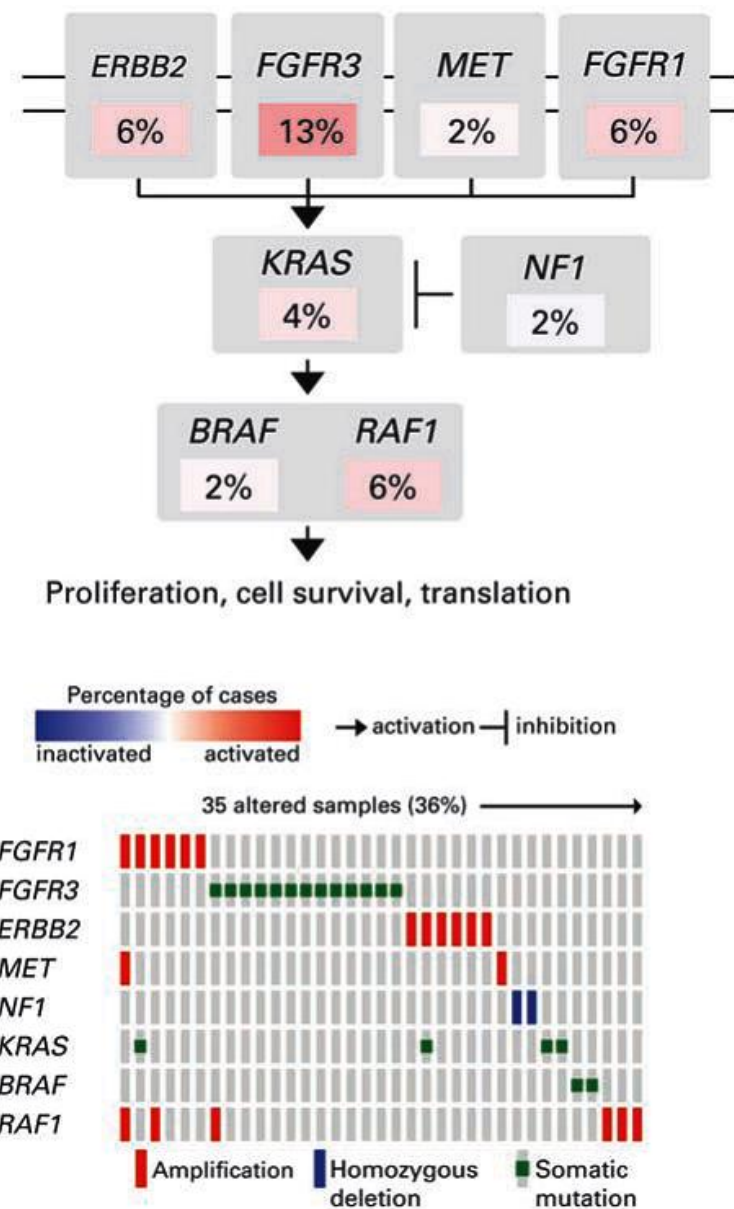


Figura 6. Co-ocurrencia de alteraciones en la vía RTK/RAS/RAF en el carcinoma vesical de alto grado. Incidencia (%) de amplificaciones, deleciones y mutaciones en receptores de la tirosin kinasa. El mapa inferior compara la distribución de cada alteración entre muestras tumorales.

(Tomado de "World Cancer Report. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization; 2014").

La patogénesis de los TVNMI se basa en alteraciones en el receptor de la tirosin kinasa FGFR-3 y H-RAS(84) y PIK3-Ca-Akt en un subconjunto de pacientes (85) (86) (87)

Las vías RAS-MAPK y PIK3K-Akt son las potencialmente más importantes en promover el crecimiento de la neoplasia urotelial. Las mutaciones activadoras de los genes RAS activan las proteínas activadas por mitógenos (MAPK) y las PI3K en el TVNMI.

Las mutaciones activadoras en los receptores de tirosín kinasa parecen ser mutuamente excluyentes con las mutaciones en la familia de genes RAS en la oncogénesis urotelial. Por otra parte, las mutaciones en PIK3CA generalmente ocurren junto con las de FGFR3.

Por otro lado la patogénesis de TVMI involucra a genes supresores de tumores como *p53*, *p16* y *Rb*. (81) (88). Figura 7.

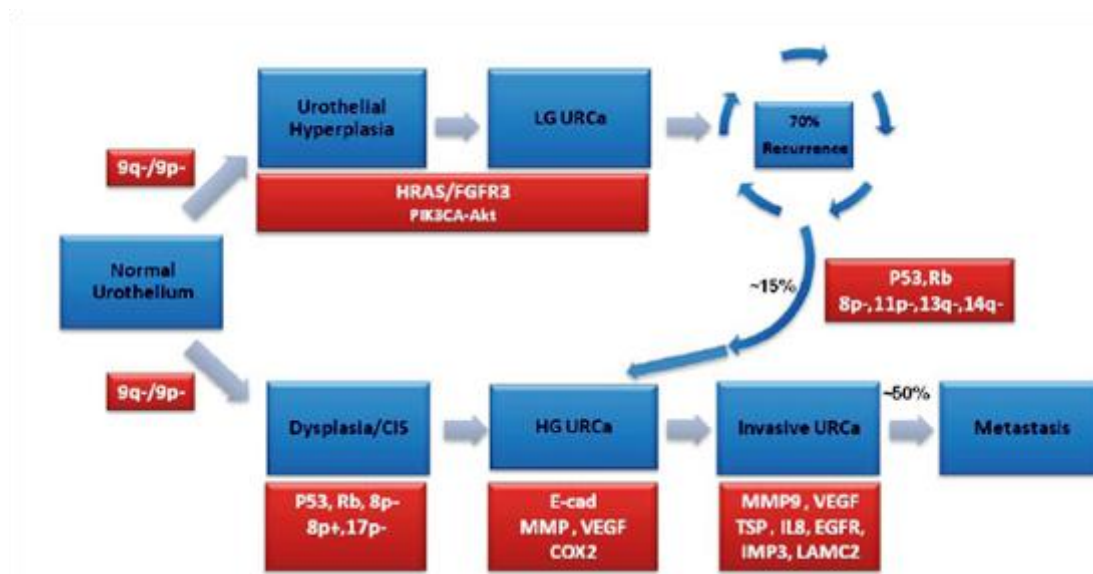


Figura 7. Vías moleculares divergente en la oncogénesis de carcinoma urotelial no músculo invasivo y músculo invasivo. (Tomado de "Bladder Cancer", 2nd International Consultations in bladder cáncer, Viena 2012).

Técnicas de estudio de las alteraciones genéticas

Las técnicas moleculares han permitido estudiar regiones genómicas concretas. Debemos recordar que un determinado gen está compuesto por un fragmento bicatenario de DNA con una secuencia de nucleótidos constante que para expresar su función tiene que formar una cadena de mRNA (transcripción) que servirá, a nivel de los ribosomas (que actúan como lectores de la información de la cadena de RNA), para formar una proteína que expresa la función de ese determinado gen. Las técnicas moleculares detectan alteraciones en cualquiera de los diferentes niveles: DNA, RNA y proteína.

Cuando queremos conocer la presencia de un gen en el DNA de un tejido utilizamos sondas complementarias de ese DNA problema, de manera que si existe se unirá a él (hibridará) y lo marcará por cualquiera de las formas descritas.

Las enzimas de restricción fragmentan el DNA cada vez que encuentran una determinada secuencia de nucleótidos. La técnica que estudia la longitud de estos fragmentos es lo que se conoce como polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP). Los fragmentos de restricción pueden variar con tan sólo el cambio de una única base del DNA, de manera que utilizando sondas específicas para regiones cromosómicas sucesivas nos permite realizar un verdadero mapa de una región cromosómica que interese estudiar. Los estudios de polimorfismos han resultado vitales en la localización de genes supresores al confirmarse la constante ausencia de una determinada región cromosómica.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite obtener un enorme número de copias de una determinada secuencia de DNA al aprovechar el mecanismo de la replicación. La DNA-polimerasa usa una de las cadenas de DNA como molde para la síntesis de otra nueva cadena complementaria en presencia de los nucleótidos necesarios.

Una variante de la PCR la constituye la PCR utilizando la transcriptasa inversa (RT-PCR). Esta técnica permite la identificación de células que expresan un determinado mRNA. Utilizando la transcriptasa inversa se consigue, a partir del RNA formar DNA monocatenario, y a partir de éste podemos aplicar la técnica de PCR.

Biomarcadores de carcinoma urotelial vesical

Un biomarcador es una característica de un proceso biológico que se puede medir objetivamente y que nos sirve como indicador de normalidad, de proceso patológico o de una respuesta a una intervención farmacológica. Se obtiene como el resultado final de una técnica de laboratorio que procesa el material biológico, obteniéndose una variable categórica o cuantitativa.

Se pueden utilizar con un fin diagnóstico: determinar el riesgo para padecer el tumor, realizar screening/diagnóstico precoz o establecer el diagnóstico; o con un fin pronóstico: determinar el pronóstico de la enfermedad, predecir la respuesta a un tratamiento, como diana terapéutica, o para monitorizar la respuesta a un tratamiento.

El biomarcador ideal tiene que ser fácil y rápido de obtener, mejorar el valor pronóstico de los marcadores pronósticos conocidos, ser eficiente y ser coste-efectivo.

Es necesario encontrar biomarcadores pronósticos para identificar a aquellos pacientes con mayor riesgo de recidiva y/o progresión, para ello se están investigando diferentes puntos del ciclo celular que involucran a genes, proteínas, alteraciones epigenéticas o factores que producen la angiogénesis. Tabla 8.

Su incorporación a la práctica clínica diaria sólo puede realizarse tras un proceso de validación en amplias cohortes independientes y posteriormente valorar la robustez del mismo en

estudios clínicos aleatorizados multiinstitucionales, de manera que ese biomarcador pueda ser incluido en los algoritmos diagnóstico-terapéuticos actuales. (89) (90)

Tabla 8. Biomarcadores pronósticos emergentes. (Tomado de “Bladder Cancer”, 2nd International Consultations in bladder cáncer, Viena 2012).

Emerging Molecular Prognostic Markers	
Superficial Non Muscle Invasive Urothelial Carcinoma (NMIBC)	Muscle Invasive Urothelial Carcinoma (MI-BC)
<p>**Proliferation index (Ki67, MIB1, S phase) **FGFR3 Mutation/Overexpression (protective) **mG (FGFR3/MIB1) **p53 inactivation/accumulation **DNA Ploidy Status Multi Target FISH HRAS ERBB3, ERBB4 overexpression (protective) Loss of E Cadherin</p> <p><u>Cell Cycle Control:</u> Downregulation of Rb expression Downregulation of p21 expression Downregulation of p27 expression Cyclin D3 overexpression Cyclin D1 overexpression</p> <p><u>**Multimarker Immunexpression Analysis:</u> (p53,p27,ki67,Rb,p21)</p> <p><u>Angiogenesis Markers:</u> VEGF overexpression HIF 1A overexpression TSP1 Overexpression</p> <p><u>Genomic and Gene Expression Array Panels</u> <u>Epigenetic Alterations:</u> RASSF1 promotor hypermethylation DAPK promotor hypermethylation APC promotor hypermethylation E Cad promotor hypermethylation EDNRB promotor hypermethylation</p>	<p>p53 inactivation/accumulation Alterations of Rb expression Loss of p21 expression Alteration of p16 expression Loss of E Cadherin</p> <p><u>RTK:</u> EGFR overexpression HER2 overexpression/amplification</p> <p><u>Angiogenesis Markers:</u> VEGF overexpression HIF 1A overexpression TSP1 Overexpression</p> <p><u>mTOR-Akt Pathway:</u> mTOR Phos S6 expression (protective)</p> <p><u>Genomic and Gene Expression Array Panels</u> <u>Epigenetic Alterations:</u> RASSF1 promotor hypermethylation E Cad promotor hypermethylation EDNRB promotor hypermethylation</p>

Biomarcadores aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para su uso clínico:

BTA test

1. Se basa en la detección del factor del complemento proteína H, que se expresa sólo en las células tumorales. La sensibilidad es del 50% para los tumores de bajo grado, más alta que la citología, pero la especificidad es inferior.

2. Nuclear Matrix Protein 22 (NMP 22)

Se basa en la detección de NMP22, que es una proteína que pertenece a la familia de las proteínas estructurales del núcleo, manteniendo su forma e involucrada en la replicación del DNA, transcripción del RNA y en la regulación de la expresión genética. Su concentración es 25 veces superior en carcinoma urotelial comparado con las células uroteliales normales. Este test está aprobado tanto para el diagnóstico como para el seguimiento. Tiene una sensibilidad entre el 34 y el 100% y una especificidad entre el 49 y el 65%.

3. Análisis de inmunofluorescencia

Está diseñado para aumentar la sensibilidad de la citología. Emplea tres anticuerpos monoclonales, M344, LDQ10 y 19A211. Los dos primeros detectan un antígeno mucina-like, mientras que el tercero detecta una forma glicosilada de alto peso molecular del antígeno carcinoembrionario en las células tumorales exfoliadas.

Se ha aprobado para vigilancia si se usa junto con la citología. La sensibilidad de ambos en conjunto es del 84%, mejorando la detección de carcinoma urotelial de bajo grado.

4. UroVysion

Es un set de hibridación in situ fluorescente (FISH) aprobado por la FDA tanto para detectar la recurrencia como para el diagnóstico en pacientes que presenten hematuria sin historia previa de carcinoma urotelial. Consiste en 4 sondas de DNA marcadas con fluorescencia, una específica para el locus 9p21 del cromosoma 9 y los otros tres para el centrómero del 3, 7 y 17. La sensibilidad es del 72% y la especificidad del 83%. Su uso es controvertido por su alto coste. (91) (92) (93) (43) (94) (95) (96) pero podrían servir para detectar la recurrencia precoz y la progresión. (97) (98) (99) (100) (101)

Biomarcadores pronósticos en TVNMI

Los actuales parámetros clínicopatológicos pronósticos son: pTNM, estadio, grado WHO/ISUP, tamaño del tumor, multifocalidad, presencia de cis y frecuencia de recurrencias previa. (102)

Se necesitan por lo tanto parámetros que puedan predecir de forma precisa aquel grupo de TVNMI que progresarán a TVMI, de forma que se realice un seguimiento y tratamiento más agresivo. (103) (104).

Hasta ahora los únicos biomarcadores involucrados en el TVNMI que se ha visto que pueden tener un futuro prometedor en el pronóstico de la enfermedad:

1. Alteraciones cromosómicas numéricas

Las alteraciones del cromosoma 9 son las primeras en las dos vías divergentes del cáncer de vejiga, siendo responsables de la creación de un ambiente de inestabilidad genética necesario para la acumulación de defectos genéticos.

Otras alteraciones numéricas o estructurales como las ganancias de 3q, 7p y las deleciones de 9p21 son eventos de especial interés dado su potencial valor diagnóstico y pronóstico. (105) (106).

2. Receptor de Tirosin Quinasas

Varios receptores de la Tirosin Quinasas (RTK) como FGFR-3, EGFR y otros de la familia ERB (HER2/neu y ERBB3) han demostrado su importancia en los tumores vesicales.

Las mutaciones en FGFR3 son comunes en los TVNMI y pueden ser utilizadas solas o en combinación con los oncogenes RAS y PIK3CA como marcadores precoces de recurrencia.

Por este motivo se han desarrollado pruebas basadas en la PCR para detectar mutaciones de FGFR3 en orina (107) (108). Una muestra de orina positiva en el ensayo diseñado por Zuiverloon et al. se asoció a un 81% de recurrencias en pacientes diagnosticados de TVNMI e incluso tuvieron un valor predictivo positivo del 90% en pacientes que presentaban la mutación FGFR3. Miyake et al. observaron que el valor predictivo positivo de la mutación de FGFR3 era superior a la citología para detectar recurrencia después de la RTUv en TVNMI primarios.

Kompier et al. diseñaron una prueba de PCR múltiple para detectar los “puntos calientes” de HRAS, KRAS, NRAS, FGFR3 y PIK3CA en muestras obtenidas por RTU embebidas en parafina, demostrando al menos una mutación en hasta el 88% de los tumores de bajo grado (86). Hernández et al. demostraron que las mutaciones en FGFR3 son más comunes en las neoplasias de bajo potencial maligno (77%), que en las TaG1/TaG2 (61 y 58%, respectivamente, que en los TaG3 (34%) y que en los T1G3 (17%). En el análisis multivariable las mutaciones en FGFR3 se asociaron a un incremento en las recurrencias de los TVNMI (109) aunque algunos estudios sugieren un rol pronóstico negativo para la amplificación o sobreexpresión de HER2/neu en TVMI. (90) (110) (111) (112).

3. P53, reguladores del ciclo celular y marcadores de proliferación

Estudios han demostrado la fuerte asociación como factor de riesgo independiente entre las mutaciones de *p53* y la progresión del cáncer de vejiga (superficial, cis y músculo-invasivo) (113) (114) (115). Además *p53* sirve como predictor de respuesta de los agentes quimioterápicos que dañan el ADN. (116) (117) (118)

Alunos estudios han demostrado el valor pronósticos de p53 en tumores T1-T2 después de la cistectomía, mostrando ser un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de progresión y de supervivencia cáncer específica. (73)

Asimismo, se ha estudiado el valor pronóstico de la sinergia de estos reguladores con las mutaciones de p53. (104) Aunque a priori el abordaje con varios marcadores puede parecer más completo, hacen falta más estudios para demostrarlo.

Los índices de proliferación Ki-67 y MIB-1 medidos mediante inmunohistoquímica también han demostrado valor pronóstico en el cáncer de vejiga.(119) (120) (121) (122)

4. Expresión de genes y análisis genómicos

Existen estudios recientes que ponen el foco en la expresión de genes que pueden servir para el diagnóstico y en la predicción de recurrencia y progresión. (123) (124) (125) (126) (8) (127)

En un estudio en el que se analizaron 105 perfiles de expresión de TVNMI y TVMI, estratificando los tumores por estadio, adenopatías y supervivencia global. Los algoritmos predictivos mostraron una precisión del 89% para el estadio determinado los genes que se expresaban diferencialmente para los TVNMI y los TVMI. Para la supervivencia global la precisión para la cohorte entera fue del 82%.

En otro se identificaron 24 genes predictores de recurrencia y progresión en tumores pTa utilizando PCR en tiempo real. Encontraron que la expresión de CCND3 tenía una sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de recurrencia del 97% y 63% respectivamente. HRAS, E2F1, BIRC%/survivin y VEGFR2 fueron predictores de progresión en el análisis univariante, en el multivariante fue la combinación de HRAS,

VEGFR2 y VEGF la que demostró una sensibilidad del 81% y una especificidad del 94% para el diagnóstico de progresión

5. Alteraciones epigenéticas

Los tres principales mecanismos epigenéticos son la metilación del DNA, las modificaciones de las histonas y el silenciamiento de genes por el RNA.

El análisis de estos mecanismos parece tener como herramienta pronóstica un futuro prometedor en el screening y el seguimiento. (128) (129) (130) (131) (132)

Entre los estudios acerca del valor diagnóstico de la metilación de los promotores, en el estudio de Lin et al, utilizaron un test para 4 genes (E-cadherina, p16,p14 y RASSF1A) en el DNA tumoral y en el DNA de la orina detectando el análisis de la hipermetilación el 85% de los tumores superficiales y de bajo grado, el 79% de los de alto grado y el 75% de los musculoinvasivos.

Un valor similar para el diagnóstico fue hallado por Cabello et al que analizaron 25 genes supresores de tumores, PTEN, CD44, WT1, GSTP1, BRCA2, RB1, TP53, BRCA1, TP73, RARB, VHL, ESR1, PAX5A, CDKN2A y PAX6 entre ellos, econtrando que BRCA1, WT1 y RARB eran los más frecuentemente metilados. (128)

6. Ploidia y análisis morfométricos

Varios estudios han demostrado el valor pronóstico independiente de la ploidia y el análisis de la fase S en los TVNMI. (133) (134) (135) (136) (137) (138) (139)

El estudio de Ali-Et-Dein et al. (133), con un tamaño muestral de 377 tests, encontró que el grado y la ploidia eran los dos únicos predictores de progresión a músculo-invasivo. Hallazgos similares fueron encontrados por Baak et al (134).

7. Otros potenciales biomarcadores

Se incluyen aquí otros biomarcadores en los que los datos obtenidos hasta la fecha son menos robustos como los moduladores de la angiogénesis HIF 1^a, HIF 2, VEGF, CA IX y trombospondina 1. (140) (141) (142)

Asímismo está por demostrar el rol del miRNA como herramienta pronóstica no invasiva. (143) (144)

Desde la perspectiva de la terapia dirigida, RTK-HRAS-MAPK (TVNMI) y P53-pRb (MI) son otras posibles vías para el manejo del cáncer vesical. Ensayos clínicos fase II que evalúan los inhibidores del receptor de la tirosin kinasa o anticuerpos monoclonales y ensayos fase I que estudian la seguridad de la terapia intravesical se hallan en con p53 y Rb se hallan en estudio. (145) (146) (147)

HIPÓTESIS

Hipótesis conceptual

El cáncer es un proceso en el que median múltiples alteraciones moleculares, a través de las cuales, se activan protooncogenes que estimulan el crecimiento celular, y genes supresores de tumor que inhiben la proliferación celular en condiciones normales, volviéndose inactivos. Como consecuencia de ese proceso, se producen desequilibrios en la producción de proteínas directamente implicadas en la regulación del ciclo celular, bien como factores de crecimiento, bien como reguladores de la muerte celular programada, conduciendo a la célula hacia una transformación neoplásica.

Las mutaciones en los codones 12 y 13 del gen K-RAS (oncogen) , polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 (gen supresor de tumores) y/o la inestabilidad de los microsatélites BAT 25, BAT 26 y D2S123 han sido involucrados en la génesis tumoral de diferentes modos en el cáncer vesical.

La hipótesis conceptual sobre la que se desarrolla este trabajo es la de que la detección de estas mutaciones, permite distinguir dentro de una serie de pacientes diagnosticados de TVNMI aquellos que tendrán un peor pronóstico.

Para tratar de demostrar esta hipótesis conceptual se desarrollaron las siguientes hipótesis operativas:

- El diagnóstico de una o varias de estas mutaciones en una serie de 74 pacientes que padecen un TVNMI de riesgo intermedio y alto, pueden ser considerados como marcadores moleculares pronósticos para la recidiva y/o progresión.
- La presencia de estas mutaciones se asocia a otras variables clínicas y oncológicas de forma que se puede crear un modelo predictivo para mejorar la información pronóstica de estos pacientes.

OBJETIVOS

A) GENERALES

1. Analizar el patrón biomolecular de los TVNMI de riesgo intermedio y alto para recidiva y/o progresión.
2. Detectar precozmente qué pacientes deben ser considerados de alto riesgo en relación con recidiva y progresión.

B) ESPECIFICOS

1. Determinar la frecuencia de las mutaciones localizadas en los codones 12 y 13 de KRAS en pacientes diagnosticados de TVNMI de de riesgo intermedio y alto para recidiva y/o progresión.
2. Determinar la frecuencia del polimorfismo Arg72Pro de TP53 en pacientes diagnosticados de TVNMI de de riesgo intermedio y alto para recidiva y/o progresión.
3. Determinar la frecuencia de la inestabilidad de los microsatélites BAT25, BAT26 y D2S123 en pacientes diagnosticados de TVNMI de de riesgo intermedio y alto para recidiva y/o progresión.
4. Estudiar la relación entre los tres biomarcadores analizados entre sí.
5. Estudiar la relación entre las tres biomarcadores analizados y los factores pronósticos clínico-patológicos relacionados con la recidiva y la progresión.
6. Estudiar la relación entre los tres biomarcadores analizados con la probabilidad de recidiva/progresión en TVNMI de riesgo intermedio y alto.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. **DISEÑO DEL ESTUDIO:** Cohorte clínica prospectiva de pacientes diagnosticados de TVNMI de riesgo intermedio y alto para recidiva y/o progresión según los criterios de EAU (33), y sometidos a RTUv, en los que se analizaron los marcadores objeto de estudio y se les realizó un seguimiento durante un periodo suficiente para analizar su comportamiento en cuanto a recidiva y/o progresión.
2. **POBLACIÓN A ESTUDIO:** Durante 12 meses (entre abril de 2012 y abril de 2013), se seleccionó una serie de 74 pacientes consecutivos intervenidos en el Servicio de Urología del Hospital Clínico San Carlos diagnosticados de TVNMI de riesgo intermedio y alto para recidiva y/o progresión según los criterios de EAU (33). Los criterios de exclusión fueron: la ausencia de consentimiento informado escrito, así como el haber sido diagnosticado y tratado previamente de otras neoplasias, que no fueran CCT.
3. **METODOLOGÍA CLÍNICA, MARCADORES Y ANÁLISIS EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD**

- FACTORES CLÍNICOS Y TUMORALES

Se recogieron los datos obtenidos de los análisis genéticos y se han incluyéndolos en una base de datos con las variables clinicopatológicas de interés. Estas variables fueron: edad, sexo, hábito tabáquico (definido como consumo de al menos 10 cigarrillos/día durante un periodo mayor de 5 años en los últimos 10 años y al menos 6 meses sin fumar para exfumadores), ingesta hídrica diaria (menos o una cantidad igual o superior al litro diario) e ingesta de frutas y verduras diaria (consumo alto: más de 3 piezas de fruta/día y más de 4 raciones verdura/semana; consumo medio: 2-3 piezas de fruta/día y 3-4 raciones de

verdura/semana; consumo bajo: menos de 2 piezas de fruta/día y menos de 2 raciones de verdura/semana).

Las variables oncológicas recogidas fueron: estadio, grado, número de RTUs previas, MMC o BCG previas y afectación del tracto urinario superior.

Mediante la RTUv, se procedió a la extirpación con asa de resección de toda la masa neoplásica. A continuación, se profundizó en la base tumoral, que se envió por separado.

Una vez finalizada la RTUv, el tejido tumoral obtenido se dividió en dos alicuotas: una destinada al estudio histopatológico, y la otra destinada al estudio de expresión proteica.

En todos los casos, en la ficha quirúrgica quedaron reflejadas las siguientes características endoscópicas: aspecto endoscópico (superficial o infiltrante), tamaño tumoral (calculado mediante campos endoscópicos a partir del diámetro del asa de resección con la equivalencia 1 campo = 0,5 cm).

- ANALISIS DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS:

Análisis de las mutaciones localizadas en los codones 12 y 13 del gen KRAS.

Previo al análisis fue necesario la extracción del DNA del tejido tumoral usando el DNasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se realizó la amplificación por PCR convencional del exón 1 del gen KRAS donde se localizan los codones 12 y 13 objeto de estudio usando como primer forward, 5'- GTG TGA CAT GTT CTA ATA TAG TCA-3' y primer reverse 5'-AAT GAC CAC GTC CTG GTA AG-3'. En electroforesis en gel de agarosa al 2 % se descartó la presencia de contaminación en las muestras. El fragmento visualizado correspondía con un tamaño de 214 pares de bases.

Los productos de las amplificaciones fueron reamplificados con el kit Big Dye 1.1 (applied biosystems) y secuenciados, por medio de secuenciación directa por electroforesis capilar, en un secuenciador automático ABI prism 3100, para establecer el tipo de mutación.

Análisis del polimorfismo Arg72Pro del gen TP53

El DNA genómico se extrajo de sangre periférica usando el DNasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El análisis del polimorfismo se realizó mediante PCR-RLFP usando la enzima de restricción BstUI (1 U a 37 °C durante 16 horas). En la amplificación de la región donde se localiza el polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 se emplearon los cebadores descritos por el grupo de Katkoori VR et al. (148) en un volumen final de 25 µl conteniendo 50 ng de DNA. El polimorfismo Arg72Pro introduce un nuevo sitio de restricción a la enzima BstUI obteniendo como resultado de la digestión fragmentos de 160 y 119 bp para la secuencia wild type Arg/Arg, una única banda para la variante Pro/Pro (279 bp) y 3 bandas para la variante heterocigota Arg/Pro (279, 160 y 119 bp). Los fragmentos digeridos se separaron en gel de agarosa al 3%. La confirmación del polimorfismo se realizó por secuenciación directa.

Análisis de la inestabilidad microsatélite (MSI)

Se extrajo DNA tanto del tejido tumoral de vejiga como de la sangre periférica correspondiente al DNA no tumoral usando el DNasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para el estudio de la inestabilidad de microsatélites se amplificaron mediante PCR convencional 3 secuencias que incluyen los microsatélites BAT25, BAT26 y D2S123. El análisis de cada microsatélite se realizó con una pareja de cebadores específicos, uno de

los oligonucleótidos de cada pareja llevaba un marcaje fluorescente. Los primers utilizados para cada producto amplificado son: Bat25: Forward: 5' - FAM-TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT-3' y reverse: 5' - TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC-3'; Bat26:Forward: 5' - TET-TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC-3' y reverse: 5' - AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C-3' y D2S123: Forward: 5' - FAM-AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA-3' y reverse: 5' - GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC-3'. El tamaño de los productos de amplificación se determinó en un secuenciador ABI prim 377 y se analizaron usando Genescan y el software Genotyper.

El resultado de la inestabilidad de microsatélites se obtuvo siguiendo los criterios establecidos por el National Cancer Institute (NCI), considerándose muestras con alta inestabilidad microsatélite cuando presentaban inestabilidad en dos o más secuencias analizadas (>30%).

- ANÁLISIS EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

El seguimiento postoperatorio consistió en la recogida periódica de signos y síntomas, estudios radiológicos y endoscópicos, y pruebas analíticas periódicas.

Las revisiones clínicas tuvieron periodicidad trimestral durante el primer año, semestral a partir de ese momento y hasta los 5 años, y anual a partir de entonces. Se realizaron estudios del tracto urinario superior (urografía intravenosa- UIV- o Uro-TAC) anualmente hasta los 5 años; sólo en caso de recidivas se procedió a nuevos controles radiológicos.

El primer control cistoscópico se realizó a los 3 meses de seguimiento; las sucesivas cistoscopias de control se realizaron a los 3 ó 6 meses durante los 2 primeros años, a los 6 ó 12 meses durante los 2 años siguientes, y con periodicidad anual a partir de ese momento.

Se definió recidiva como la detección de cualquier tumor de estirpe urotelial en cualquier parte del tracto urinario mediante citología, cistoscopia o biopsia vesical. No obstante, los casos con citología positiva fueron posteriormente confirmados mediante estudio cistoscópico, biopsia o pruebas de imagen del tracto urinario superior (UIV, TAC). El tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la aparición de la primera recidiva se definió como supervivencia libre de recidiva (SLR).

Por progresión se entendió el incremento de la categoría T. El tiempo transcurrido entre el diagnóstico de la enfermedad y la progresión se definió como supervivencia libre de progresión (SLP).

Siguiendo el protocolo del Servicio de Urología del Hospital Clínico San Carlos vigente en aquel momento, los pacientes con TVNMI, si sus condiciones clínicas lo permitían, recibieron mitomicina (MMC) o BCG en caso de resultar tumores de alto riesgo (fundamentalmente T1 G3).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó análisis descriptivo de las variables. Las variables cualitativas se presentaron con su distribución de frecuencias; las cuantitativas se resumieron en su media y desviación estándar o su mediana y rango intercuartílico cuando las variables no tenían una distribución normal.

La asociación entre variables cualitativas se evaluó con el test de Chi Cuadrado o prueba exacta de Fisher en el caso de que más de un 25% de los valores esperados fueran menores de 5. Ambas son pruebas estadísticas de contraste de hipótesis para analizar datos agrupados en categorías y se presentan como frecuencias con las que se da cada categoría.

Las variables cuantitativas se compararon con el test de t Student (en comparaciones de una variable con dos categorías, es decir, cualitativa dicotómica) y las medianas con el test no paramétrico de la mediana, para ello se calcula la mediana de todos los datos conjuntamente. Después se divide cada muestra en dos subgrupos: uno para aquellos datos que se sitúan por encima de la mediana y otro para los que se sitúan por debajo. La prueba de Chi Cuadrado determinará si las frecuencias observadas difieren de las esperadas.

Se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos en todos los casos y se contrastó la hipótesis de homogeneidad de varianzas.

Para el análisis estadístico de la probabilidad de supervivencia utilizamos el método de Kaplan-Meier para variables independientes para el estudio de eventos: recidiva y progresión. El método utiliza el concepto de probabilidad condicionada, calculando la probabilidad de que, habiendo llegado vivo al final del intervalo "k", sobreviva también el "k+1". El producto de estas probabilidades condicionadas sucesivas de cada intervalo, irá proporcionando las tasas acumuladas de supervivencia, desde el comienzo del estudio hasta el final de cada uno de ellos. La comparación de las funciones de supervivencia de los distintos subgrupos se realizó mediante el test exacto de Breslow, consistente en comparar el número de eventos de cada uno de los subgrupos, con el número de eventos esperados en el caso de que la distribución de la variable dependiente fuera la misma en todas las categorías (hipótesis nula). Se obtuvieron las tablas de supervivencia, el tiempo medio de supervivencia en meses, así como las curvas de supervivencia.

Las diferencias entre las curvas de supervivencia se examinaron por el método de Log-Rank. Para los cálculos de la supervivencia y de supervivencia libre de enfermedad, se consideró el tiempo transcurrido entre el momento de la intervención quirúrgica y la

fecha de la última revisión o fallecimiento, o la fecha de la recidiva tumoral en su caso. Mediante un estudio estadístico univariante inicial seleccionaron los factores con carácter pronóstico. Una vez seleccionados, se realizó un estudio multivariante (análisis de la supervivencia con covariantes o modelo de Cox) que permite calcular y cuantificar la influencia de cada uno de los factores en el pronóstico del paciente, y predecir el tiempo de supervivencia de un determinado sujeto a partir de los valores que toma en las variables explicativas o pronósticas.

Se presentaron las “razones de tasas” (*Hazard Ratio*, HR) ajustados con sus intervalos de confianza al 95%; para la interpretación de los parámetros, se consideraron los signos positivos como un aumento en la tasa instantánea de riesgo (por lo tanto tendrá peor pronóstico un valor alto de la variable x). La contribución de una variable x , se valoró con el exponente e^B , que es el factor por el que se multiplica la tasa de riesgo instantáneo de un sujeto cuando la variable x se incrementa en una unidad. Este exponente se interpreta como el riesgo relativo en el instante t de los sujetos. En variables dicotómicas es pasar de la ausencia (0) a la presencia (1) del factor x . En variables cuantitativas el incremento es lineal de la tasa de riesgo cuando se incrementa la variable x en una unidad. Este aumento es proporcional en todos los valores que toma la variable. En variables policotómicas una categoría se toma como referencia y tiene riesgo relativo de 1; el resto se comparan con ésta.

Se rechazó la hipótesis nula en todos los contrastes de hipótesis con un error de tipo I o error alfa menor a 0,05.

Para medir la capacidad del modelo para diferenciar a los individuos que sufrirán el evento de interés (recidiva) de los que no, se utilizó el índice c de Harrel, que se utiliza para modelos de supervivencia.

El índice C calcula la probabilidad de que, para un par de pacientes comparables elegidos al azar, el paciente con probabilidad de riesgo más alta experimente un evento antes que el paciente con menor riesgo. Un valor de 1 significaría la discriminación perfecta, y un valor de 0,5 sería una discriminación próxima al azar.

Para el análisis de datos se utilizó el Statistical Package for Social Sciences (SPSS) para Windows, versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

La recogida de datos no conllevó ningún cambio en la práctica clínica sobre los pacientes.

En todo momento se siguieron las recomendaciones de la Declaración de Helsinki con respecto a la investigación en humanos, y se anonimizaron todas las bases de datos en base a las normas para la adecuada protección de los datos personales que establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/1999, de 13 de diciembre de 1999, en nuestro país.

Este estudio recibió la aprobación por el Comité de Ética del Hospital Clínico San Carlos el 23 de marzo del año 2011.

RESULTADOS

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Se incluyeron 74 pacientes en el estudio. La edad media de los mismos fue de 70,72 años (DE: 10,92). Sesenta y un pacientes fueron hombres (82,4%) y 13 fueron mujeres (17,6%).

En cuanto al hábito tabáquico, 29 pacientes (39,2%) eran fumadores activos, 31 (41,9%) eran exfumadores y 14 (18,9) no habían fumado nunca. Entre los exfumadores y fumadores 31 pacientes (41,9%) fumaban tabaco rubio, 28 (37,8%) negro y 1(1,4%) puros.

La cantidad de agua ingerida diaria fue de 1 litro o más en 33 pacientes (44,6%) y de menos de un litro en 41 (55,4%). La ingesta de frutas y verduras fue alta en 15 pacientes (20,3%), media en 40 (54,1%) y baja en 19 (25,7%).

La mediana de tiempo de seguimiento fue de 46,81 meses (Rango Intercuartílico: 33,55-61,65) y la media 45,68 meses (Desviación típica: $\pm 20,31$).

Resumen datos demográficos (Tabla 9).

Tabla 9. Antecedentes personales.

Número de pacientes		74
Edad (media, DE)		70,72 (10,92)
Sexo (número, %)	Hombre	61 (82,4)
	Mujer	13 (17,6)
Consumo tabaco (número, %)	Activo	29 (39,2)
	No	14 (18,9)
	EX	31 (41,9)
Tipo de tabaco	Rubio	31 (41,9)
	Negro	28 (37,8)
	Puros	1 (1,4)
Cantidad agua ingerida diaria (número, %)	1 litro o más	33 (44,6)
	Menos de 1 litro	41 (55,4)
Ingesta frutas y verduras (número, %)	Alta	15 (20,3)
	Media	40 (54,1)
	Baja	19 (25,7)

Cuarenta y cinco pacientes (60,8%) habían sido sometidos a al menos dos RTUv previamente, mientras que 29 pacientes (39,2,78%) habían sido sometidos a 3 o más RTUv.

En lo referente al estadio de la muestra, 49 (66,2%) y 25 (33,8%), fueron Ta y T1 respectivamente.

Cincuenta y siete pacientes (77%) fueron de bajo grado y 17 (23%) de alto grado. (Figura 1).

Cuarenta y cuatro (59,5%) recibieron instilaciones con MMC, y 21 (30,26%) recibieron instilaciones con BCG.

Durante el seguimiento, 4 pacientes (5,4%) padecieron afectación del TUS.

Veinticinco pacientes (33,8%) recidivaron y 3 pacientes (4,1%) progresaron.

Resumen variables oncológicas (Tabla 10).

Tabla 10. Variables oncológicas.

Número de RTUs previas (número, %)	Hasta dos	45 (60,8)
	Tres o más	29 (39,2)
Estadio (número, %)	Ta	49 (66,2)
	T1	25 (33,8)
Grado (número, %)	Bajo	57 (77)
	Alto	17 (23)
Instilaciones MMC (número, %)	Sí	44 (59,5)
	No	30 (40,5)
Instilaciones BCG (número, %)	Sí	21 (28,4)
	No	51 (68,9)
Recidiva (número, %)	Sí	25 (33,8)
	No	49 (66,2)
Progresión (número, %)	Sí	3 (4,1)
	No	71 (95,9)
Afectación del tracto urinario superior (número, %)	Sí	4 (5,4)
	No	72 (94,6)

La mediana de tiempo hasta la recidiva fue de 8 meses (5,7-12,7) y de progresión 14 meses (P75: 12). (Tabla 11).

Tabla 11. Tiempo hasta recidiva/progresión.

	N	Mediana seguimiento (meses)	Mediana de tiempo hasta recidiva/progresión (meses)
Recidiva	25	43,7 (P25: 30,3 – P75: 63,4)	8 (P25: 5,5- P75: 13,5)
Progresión	3	35,6 (P75: 24,2)	14 (P75: 12,0)

En lo que al análisis de las mutaciones estudiadas se refiere, 1 paciente (1,4%) presentó mutación en KRAS 12 (Figura 8) y ninguno en KRAS 13. En el estudio de inestabilidad de microsatélites, 5 pacientes (6,8%) presentaron mutación en BAT 25, 4 (5,4%) en BAT26 y 6 (8,1%) en D2S123 (Figura 9). Respecto al polimorfismo Arg72Pro del gen TP53, 50 pacientes (67,6%) fueron homocigotos mutados, 23 pacientes (31,1%) fueron heterocigotos mutados, y 1 paciente (1,4%), no presentaban la mutación (Figura 10). (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución mutaciones.

Mutación KRAS 12 (n, %)	Sí	1 (1,4)
	No	73 (98,6)
Mutación KRAS 13 (n, %)	No	76 (100)
Mutación BAT25 MSI (n, %)	Sí	5 (6,8)
	No	69 (93,2)
Mutación BAT 26 MSI (n, %)	Sí	4 (5,4)
	No	70 (94,6)
Mutación D2S123 MSI (n, %)	Sí	6 (8,1)
	No	68 (91,9)
Polimorfismo TP53 (n, %)		
Homocigoto mutado		50 (67,6)
Heterocigoto mutado		23 (31,1)
Wild type		1 (1,4)

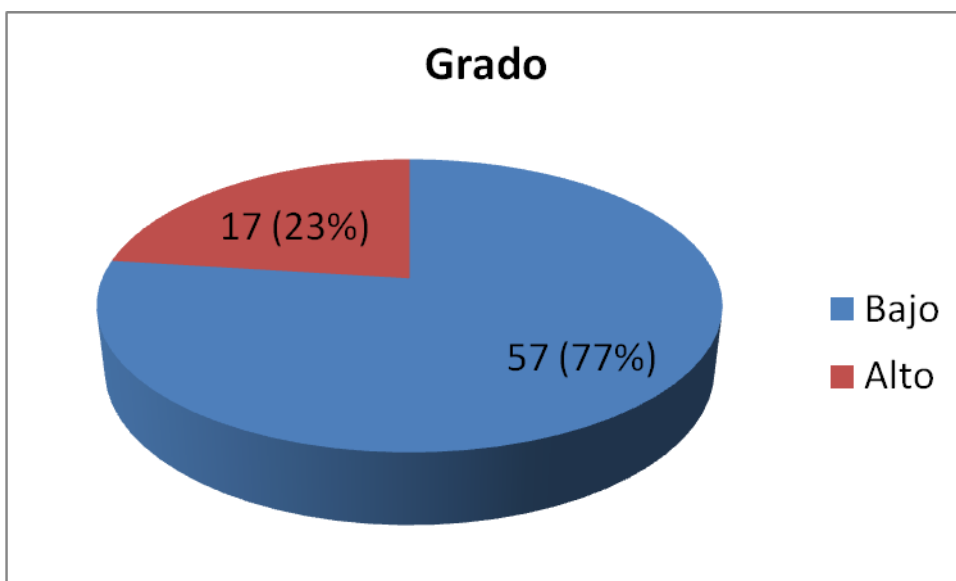
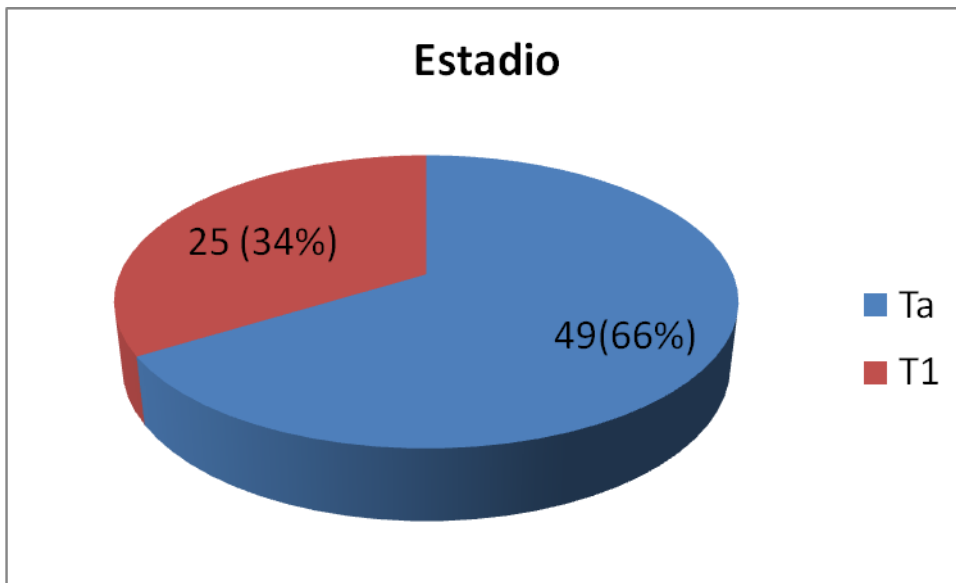


Figura 8. Distribución por estadio y grado tumoral.

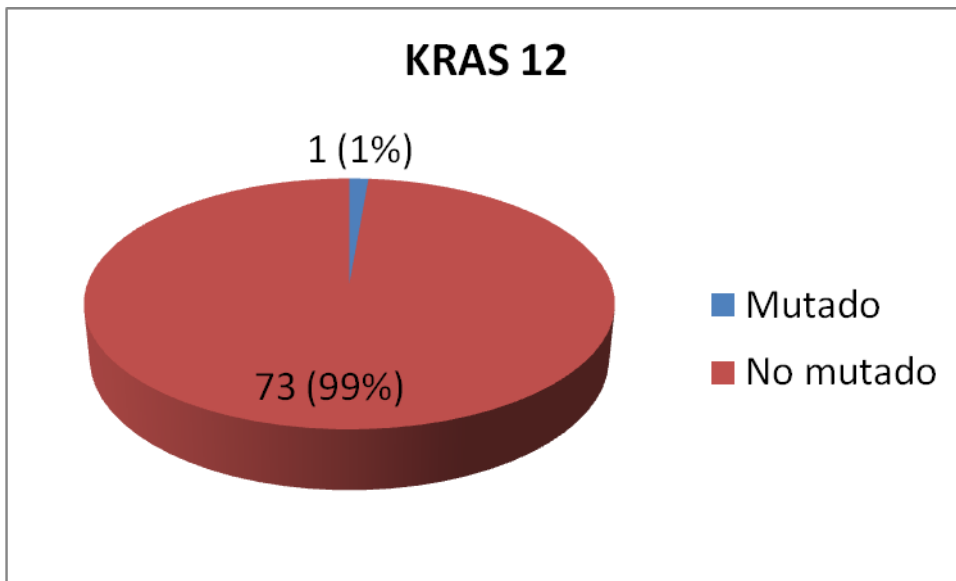


Figura 9. Distribución mutación KRAS 12.

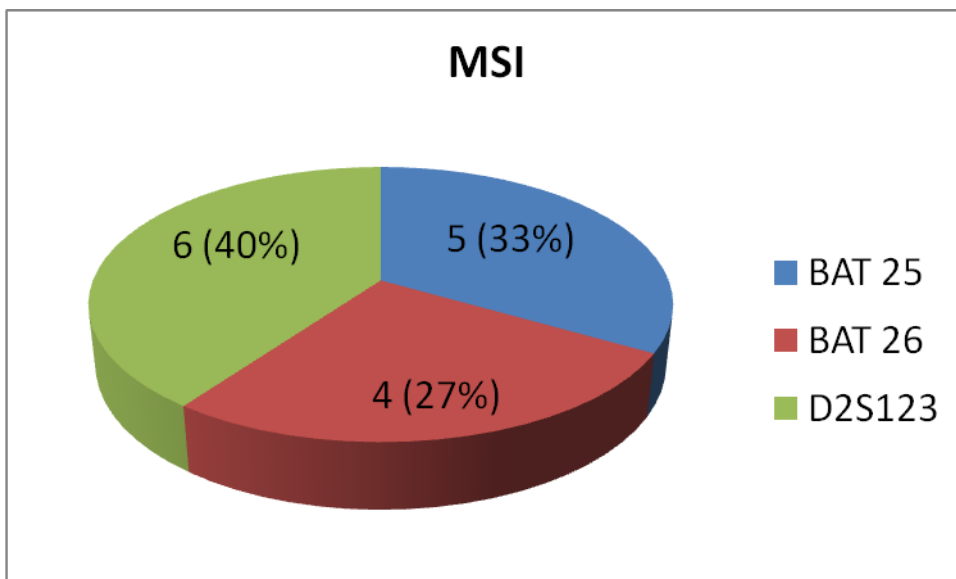


Figura 10. Distribución inestabilidad microsatélites BAT25, BAT26 y D2S123.

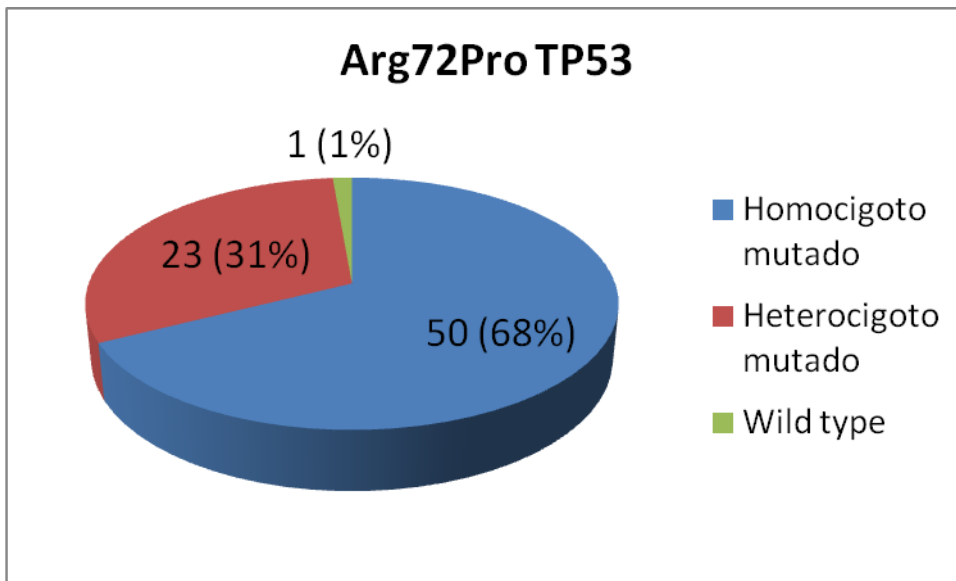


Figura 11. Distribución polimorfismo Arg72Pro TP53.

ESTADÍSTICA ANALÍTICA.

ANÁLISIS UNIVARIANTE

Se realizó un análisis univariante para valorar si existe relación entre cada mutación y las variables recogidas en antecedentes personales, las variables oncológicas y con el resto de mutaciones.

KRAS 12

El único paciente que presentó la mutación en KRAS 12 fue una mujer de más de 75 años, no fumadora y sin otros antecedentes de interés.

A continuación se describen las relaciones entre la mutación de KRAS12 con los antecedentes personales y con las variables oncológicas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con relación a ninguno de ellos (Tabla 13 y 14).

Tabla 13. Análisis de la relación entre la mutación KRAS12 y los antecedentes personales.

		KRAS 12+ (n, %)	KRAS 12- (n, %)	P
Sexo				0,17
	Hombre	0 (0)	61 (83,6)	
	Mujer	1 (100)	12 (16,4)	
Edad				0,39
	Menos de 75	0 (0)	45 (61,6)	
	75 o más	1 (100)	28 (38,4)	
Fumador				0,23
	Sí	0 (0)	27 (37)	
	No	1 (100)	18 (24,7)	
	Ex	0 (0)	28 (38,4)	

La paciente que presentó la mutación en KRAS 12 se le habían realizado un máximo de 2 RTUV previas, el tumor fue un Ta de bajo grado y no presentó afectación del TUS.

Tabla 14. Análisis de la relación entre la mutación KRAS 12 y las variables oncológicas.

	KRAS 12+ (n, %)	KRAS 12- (n, %)	P
Nº RTU previas			0,60
Hasta dos	1 (100)	44 (60,3)	
Tres o más	0 (0)	29 (39,7)	
Estadio			0,66
Ta	1 (100)	48 (65,8)	
T1	0 (0)	25 (34,2)	
Grado			0,77
Bajo grado	1 (100)	56 (76,7)	
Alto grado	0 (0)	17 (23,3)	
Afectación TUS			0,94
Sí	0 (0)	4 (5,5)	
No	1 (100)	69 (94,5)	

KRAS 13

No se realizó el análisis al no presentar ningún paciente de la serie la mutación estudiada.

BAT 25 MSI

Cinco pacientes presentaron la mutación BAT 25 MSI, de los cuales 4 fueron hombres y una fue mujer. Los 5 presentaron una edad inferior a los 75 años. Respecto al hábito tabáquico 2 eran fumadores activos y 3 no habían fumado nunca.

Tabla 15. Análisis de la relación entre BAT 25 MSI y los antecedentes personales.

	BAT 25 MSI + (n, %)	BAT 25 MSI - (n, %)	P
Sexo			0,63
Hombre	4 (80)	57 (82,6)	
Mujer	1 (20)	12 (17,4)	
Edad			0,07
Menos de 75	5 (100)	40 (58)	
75 o más	0 (0)	29 (42)	
Fumador			0,19
Sí	3 (60)	24 (34,8)	
No	2 (40)	17 (24,6)	
Ex	0 (0)	28 (40,6)	

Respecto al número de RTUs previas, 2 pacientes habían sido sometidos hasta 2 RTU previas y 3, a tres o más.

En cuanto al estadio tumoral, 3 pacientes fueron Ta y dos T1. Tres fueron de bajo grado y 2 de alto grado. Ninguno sufrió afectación del TUS. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la mutación BAT 25 MSI con los antecedentes personales y con las variables oncológicas (Tabla 15) (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis de la relación entre BAT 25 MSI y las variables oncológicas.

	BAT 25 MSI + (n, %)	BAT 25 MSI - (n, %)	P
Nº RTU previas			0,29
Hasta dos	2 (40)	43 (62,3)	
Tres o más	3 (60)	26 (37,7)	
Estadio			0,55
Ta	3 (60)	46 (66,7)	
T1	2 (40)	23 (33,3)	
Grado			0,32
Bajo grado	3 (60)	54 (78,3)	
Alto grado	2 (40)	15 (21,7)	
Afectación TUS			0,75
Sí	0 (0)	4 (5,8)	
No	5 (100)	65 (94,2)	

BAT 26 MSI.

De los 4 pacientes que presentaron esta mutación, 3 fueron mujeres y uno hombre, mientras que en las que no la presentaron, 60 fueron hombres y 10 mujeres, siendo estadísticamente significativas esta diferencia.

Dos pacientes fueron menores de 75 años y dos tenían 75 o más años.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de las variables (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis de la relación entre BAT 26 MSI y los antecedentes personales.

		BAT 26 MSI + (n, %)	BAT 26 MSI - (n, %)	P
Sexo				0,01
	Hombre	1 (25)	60 (85,7)	
	Mujer	3 (75)	10 (14,3)	
Edad				0,51
	Menos de 75	2 (50)	43 (61,4)	
	75 o más	2 (50)	27 (38,6)	
Fumador				0,24
	Sí	2 (50)	25 (35,7)	
	No	2 (50)	17 (24,3)	
	Ex	0	28 (40)	

En cuanto a las variables oncológicas, dos pacientes habían sometido hasta 2 RTUs previamente, y otros dos a tres o más.

En cuanto al estadio tumoral, 3 pacientes fueron Ta y uno T1. Los 4 tumores fueron de bajo grado. Un paciente presentó afectación del TUS. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para BAT26 MSI en las variables oncológicas (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis de la relación entre BAT 26 MSI y las variables oncológicas.

	BAT 26 MSI + (n, %)	BAT 26 MSI - (n, %)	p
Nº RTU previas			0,51
Hasta dos	2 (50)	43 (61,4)	
Tres o más	2 (50)	27 (38,6)	
Estadio			0,58
Ta	3 (75)	46 (65,7)	
T1	1 (25)	24 (34,3)	
Grado			0,34
Bajo grado	4 (100)	53 (75,7)	
Alto grado	0 (0)	17 (24,3)	
Afectación TUS			0,2
Sí	1 (25)	3 (4,3)	
No	3 (75)	67 (95,7)	

D2S123 MSI

Los 6 pacientes que presentaron esta mutación fueron hombres. Cuatro tenían menos de 75 años.

Cuatro pacientes eran fumadores activos y 2 ex fumadores. No se obtuvieron diferencias entre D2S123 en función de los antecedentes personales (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis de la relación entre D2S123 MSI y los antecedentes personales.

	D2S123 MSI + (n, %)	D2S123 MSI - (n, %)	p
Sexo			0,58
Hombre	6 (100)	55 (80,9)	
Mujer	0 (0)	13 (19,1)	
Edad			0,56
Menos de 75	4 (66,7)	41 (60,3)	
75 o más	2 (33,3)	27 (39,7)	
Fumador			0,27
Sí	4 (66,7)	25 (36,8)	
No	0 (0)	14 (20,6)	
Ex	2 (33,3)	29 (42,6)	

En cuanto a las variables oncológicas, 3 pacientes habían sido sometidos a menos de 3 RTUs y 3 pacientes a tres o más RTUs.

Respecto al estadio tumoral, 2 pacientes fueron Ta y cuatro T1. Tres tumores fueron de alto grado y 3 de bajo grado y ninguno presentó afectación del TUS. No se obtuvieron asociaciones estadísticamente significativas entre D2123 MSI y las variables oncológicas (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis de la relación entre D2S123 MSI y las variables oncológicas.

	D2S123 MSI + (n, %)	D2S123 MSI - (n, %)	p
Nº RTU previas			0,67
Hasta dos	3 (50)	42 (61,8)	
Tres o más	3 (50)	26 (38,2)	
Estadio			0,17
Ta	2 (33,3)	47 (69,1)	
T1	4 (66,7)	21 (30,9))	
Grado			0,13
Bajo grado	3 (50)	54 (79,4)	
Alto grado	3 (50)	14 (20,6)	
Afectación TUS			0,7
Sí	0 (0)	4 (5,9)	
No	6 (100)	64 (94,1)	

Polimorfismo Arg72Pro del gen TP53

De los pacientes homocigotos mutados para el gen TP53, 42 fueron hombres y 8 mujeres, 29 tenían menos de 75 años.

Dieciséis pacientes fueron fumadores, 19 exfumadores y 15 no fumaban.

De los heterocigotos, 18 fueron hombres y 5 mujeres. Quince eran menores de 75 años y 8 tenían 75 o más años.

Diez pacientes eran fumadores activos, 3 no fumaban y 10 eran exfumadores. No se obtuvieron diferencias entre el polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 en función de los antecedentes personales (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis de la relación entre el polimorfismo Arg72Pro TP53 y los antecedentes personales.

Polimorfismo Arg72Pro TP53				
	Homocigoto mutado (n, %)	Heterocigoto mutado (n, %)	Wild type (n, %)	P
Sexo				0,75
Hombre	42 (84)	18 (78,3)	1 (100)	
Mujer	8 (16)	5 (21,7)	0 (0)	
Edad				0,6
Menos de 75	29 (58)	15 (65,2)	1 (100)	
75 o más	21 (42)	8 (34,8)	0 (0)	
Fumador				0,5
Sí	16 (32)	10 (43,5)	1 (100)	
No	15 (30)	4 (17,4)	0 (0)	
Ex	19 (38)	9 (39,1)	0 (0)	

En cuanto a las variables oncológicas, de los homocigotos mutados, 29 habían sido sometidos a un máximo de 2 RTUs previas y 21 a 3 o más RTUs.

Respecto al estadio, 28 pacientes presentaron un Ta y 22 T1. Treinta y seis pacientes presentaron un tumor de bajo grado y 14 de alto grado. Dos pacientes sufrieron afectación del TUS.

En el grupo de heterocigotos, 16 pacientes habían sido sometidos a un máximo de 2 RTUs y 7 a tres o más RTUs. En cuanto al estadio, 20 pacientes presentaron un tumor Ta y 3 T1. Veinte fueron de bajo y 3 de alto grado. Dos pacientes de los 24 sufrieron afectación del TUS.

Respecto al wild type, el paciente de este grupo había sido sometido a 3 RTUs o más, presentó citologías positivas, padeció un tumor Ta de bajo grado. No sufrió afectación del TUS.

Se observó una asociación estadísticamente significativa entre el estadio y la mutación del polimorfismo Arg72Pro TP53, siendo la mayor parte de tumores estadio pT1 homocigotos

mutados, mientras que en los tumores pTa se repartió su frecuencia entre homo y heterocigotos mutados. No se obtuvieron diferencias entre el polimorfismo y el resto de variables (Tabla 22).

Tabla 22. Análisis de la relación entre el polimorfismo Arg72Pro TP53 y las variables oncológicas.

Polimorfismo Arg72Pro TP53				P
	Homocigoto mutado (n, %)	Heterocigoto mutado (n, %)	Wild type (n, %)	
Nº RTU previas				0,29
Hasta dos	29 (58)	16 (69,6)	0 (0)	
Tres o más	21 (42)	7 (30,4)	1 (100)	
Estadio				0,02
Ta	28 (56)	20 (87)	1 (100)	
T1	22 (44)	3 (13)	0 (0)	
Grado				0,31
Bajo grado	36 (72)	20 (87)	1 (100)	
Alto grado	14 (28)	4 (13)	0 (0)	
Afectación TUS				
Sí	2 (4)	2 (8,3)	0 (0)	
No	48 (96)	21 (91,3)	2 (100)	0,69

Análisis de asociación entre mutaciones

No se obtuvieron asociaciones estadísticamente significativas entre la presencia de las diferentes mutaciones.

BAT 25 MSI- Mutación KRAS12

El único paciente que presentó la mutación KRAS 12 no presentó la MSI en BAT 25. Tabla 23.

Tabla 23. Análisis univariante de la relación entre BAT 25 MSI y la mutación KRAS 12.

			KRAS 12		
			Mutado	No mutado	Total
BAT 25 MSI	Mutado	n	0	5	5
		% BAT 25 MSI	0,0%	100,0%	100,0%
		% KRAS 12	0,0%	6,8%	6,8%
		% Total	0,0%	6,8%	6,8%
	No Mutado	n	1	68	69
		% BAT 25 MSI	1,4%	98,6%	100,0%
		% KRAS 12	100,0%	93,2%	93,2%
		% Total	1,4%	91,9%	93,2%
	Total	n	1	73	74
		% BAT 25 MSI	1,4%	98,6%	100,0%
		% KRAS 12	100,0%	100,0%	100,0%
		% Total	1,4%	98,6%	100,0%

p= 0,93.

BAT26 MSI-KRAS 12

Asimismo, el paciente con la mutación KRAS 12 no presentaba BAT 26 MSI. Tabla 24.

Tabla 24. Análisis univariante de la relación entre BAT 26 MSI y la mutación KRAS 12.

			KRAS 12		
			Mutado	No mutado	Total
BAT 26 MSI	Mutado	n	0	4	4
		% BAT 26 MSI	0,0%	100,0%	100,0%
		% KRAS 12	0,0%	5,5%	5,4%
		% Total	0,0%	5,4%	5,4%
	No mutado	n	1	69	70
		% BAT 26 MSI	1,4%	98,6%	100,0%
		% KRAS 12	100,0%	94,5%	94,6%
		% Total	1,4%	93,2%	94,6%
	Total	n	1	73	74
		% BAT 26 MSI	1,4%	98,6%	100,0%
		% KRAS 12	100,0%	100,0%	100,0%
		% Total	1,4%	98,6%	100,0%

p= 0,94

D2S123 MSI –Mutación KRAS12

El paciente con la mutación KRAS 12 tampoco presentó D2S123 MSI (Tabla 25).

Tabla 25. Análisis univariante de la relación entre D2S123 MSI y la mutación de KRAS 12.

			KRAS 12		
			Mutado	No mutado	Total
D2S123	Mutado	n	0	6	6
		% D2S123 MSI	0,0%	100,0%	100,0%
		% KRAS 12	0,0%	8,2%	8,1%
		% Total	0,0%	8,1%	8,1%
	No mutado	n	1	67	68
		% D2S123 MSI	1,5%	98,5%	100,0%
		% KRAS 12	100,0%	91,8%	91,9%
		% Total	1,4%	90,5%	91,9%
	Total	n	1	73	74
		% D2S123 MSI	1,4%	98,6%	100,0%
		% KRAS 12	100,0%	100,0%	100,0%
		% Total	1,4%	98,6%	100,0%

p= 0,92

Polimorfismo Arg72Pro TP53-Mutación de KRAS12

En cuanto a la mutación en TP53, el paciente con mutación en KRAS 12 era heterocigoto para dicha mutación (Tabla26).

Tabla 26. Análisis univariante de la relación entre el polimorfismo Arg72Pro TP53 y la mutación de KRAS 12.

			KRAS 12		
			Mutado	No mutado	Total
Polimorfismo Arg72Pro TP53	Homocigoto mutado	N	0	50	50
		% TP53 MSI	0,0%	100,0%	100,0%
		% KRAS 12	0,0%	68,5%	67,6%
		% Total	0,0%	67,6%	67,6%
	Heterocigoto mutado	N	1	22	23
		% TP53 MSI	4,3%	95,7%	100,0%
		% KRAS 12	100,0%	30,1%	31,1%
		% Total	1,4%	29,7%	31,1%
	Wild type	N	0	1	1
		% TP53 MSI	0,0%	100,0%	100,0%
		% KRAS 12	0,0%	1,4%	1,4%
		% Total	0,0%	1,4%	1,4%
	Total	N	1	73	74
		% TP53 MSI	1,4%	98,6%	100,0%
		% KRAS 12	100,0%	100,0%	100,0%
		% Total	1,4%	98,6%	100,0%

p= 0,32

BAT26 MSI- BAT 25 MSI

Ninguno de los 5 pacientes que presentaban BAT 25 MSI, presentaron BAT 26 MSI (Tabla 27).

Tabla 27. Análisis univariante de la relación entre BAT 26 MSI y BAT 25 MSI.

			BAT25MSI		
			Mutado	No mutado	Total
BAT26MSI	Mutado	n	0	4	4
		% BAT 26 MSI	0,0%	100,0%	100,0%
		% BAT 25 MSI	0,0%	5,8%	5,4%
		% Total	0,0%	5,4%	5,4%
	No mutado	n	5	65	70
		% BAT 26 MSI	7,1%	92,9%	100,0%
		% BAT 25 MSI	100,0%	94,2%	94,6%
		% Total	6,8%	87,8%	94,6%
	Total	n	5	69	74
		% BAT 26 MSI	6,8%	93,2%	100,0%
		% BAT 25 MSI	100,0%	100,0%	100,0%
		% Total	6,8%	93,2%	100,0%

P= 0,75

D2S123 MSI- BAT 25 MSI

Uno de los 6 pacientes que presentó D2S123 MSI presentaba también BAT25 MSI (Tabla 28).

Tabla 28. Análisis univariante de la relación entre D2S123 MSI y BAT 25 MSI.

			BAT25MSI		
			Mutado	No mutado	Total
D2S123MSI	Mutado	n	1	5	6
		% D2S123 MSI	16,7%	83,3%	100,0%
		% BAT 25 MSI	20,0%	7,2%	8,1%
		% Total	1,4%	6,8%	8,1%
	No mutado	n	4	64	68
		% D2S123 MSI	5,9%	94,1%	100,0%
		% BAT 25 MSI	80,0%	92,8%	91,9%
		% Total	5,4%	86,5%	91,9%
	Total	n	5	69	74
		% D2S123 MSI	6,8%	93,2%	100,0%
		% BAT 25 MSI	100,0%	100,0%	100,0%
		% Total	6,8%	93,2%	100,0%

p= 0,35

Polimorfismo Arg72Pro TP53- BAT 25 MSI

De los 50 homocigotos mutados para el polimorfismo Arg72Pro TP53, 4 presentaron BAT 25 MSI.

De los 23 heterocigotos mutados, 1 presentó BAT 25 MSI.

El paciente wild type presentó BAT 25 MSI (Tabla 29).

Tabla 29. Análisis univariante de la relación entre el polimorfismo Arg72 Pro TP53 y BAT 25 MSI.

			BAT 25 MSI		
			Mutado	No mutado	Total
Polimorfismo Arg72Pro TP53	Homocigoto mutado	N	4	46	50
		% TP53 MSI	8,0%	92,0%	100,0%
		% BAT 25 MSI	80,0%	66,7%	67,6%
		% Total	5,4%	62,2%	67,6%
	Heterocigoto mutado	N	1	22	23
		% TP53 MSI	4,3%	95,7%	100,0%
		% BAT 25 MSI	20,0%	31,9%	31,1%
		% Total	1,4%	29,7%	31,1%
	Wild type	N	0	1	1
		% TP53 MSI	0,0%	100,0%	100,0%
		% BAT 25 MSI	0,0%	1,4%	1,4%
		% Total	0,0%	1,4%	1,4%
	Total	N	5	69	74
		% TP53 MSI	6,8%	93,2%	100,0%
		% BAT 25 MSI	100,0%	100,0%	100,0%
		% Total	6,8%	93,2%	100,0%

P= 0,81.

D2S123 MSI- BAT26 MSI

De los 6 pacientes con D2S123 MSI, ninguno presentó BAT 26 MSI (Tabla 30).

Tabla 30. Análisis univariante de la relación entre D2S123 MSI y BAT 26 MSI.

			BAT 26 MSI		
			Mutado	No mutado	Total
D2S123MSI	Mutado	n	0	6	6
		% D2S123 MSI	0,0%	100,0%	100,0%
		% BAT 26 MSI	0,0%	8,6%	8,1%
		% Total	0,0%	8,1%	8,1%
	No mutado	n	4	64	68
		% D2S123 MSI	5,9%	94,1%	100,0%
		% BAT 26 MSI	100,0%	91,4%	91,9%
		% Total	5,4%	86,5%	91,9%
	Total	n	4	70	74
		% D2S123 MSI	5,4%	94,6%	100,0%
		% BAT 26 MSI	100,0%	100,0%	100,0%
		% Total	5,4%	94,6%	100,0%

P= 0,70

Polimorfismo Arg72Pro TP53-BAT 26

De los 50 homocigotos mutados para TP53, 3 presentaron BAT 26 MSI.

De los 23 heterocigotos mutados, 1 presentó BAT 26 MSI.

El paciente wild type no presentó BAT 26 MSI (Tabla 31).

Tabla 31. Análisis univariante de la relación entre el polimorfismo Arg72Pro TP53 y BAT 26 MSI.

			BAT 26 MSI		
			Mutado	No mutado	Total
Polimorfismo Arg72Pro TP53	Homocigoto mutado	N	3	47	50
		% TP53 MSI	6,0%	94,0%	100,0%
		% BAT 26 MSI	75,0%	67,1%	67,6%
		% Total	4,1%	63,5%	67,6%
	Heterocigoto mutado	N	1	22	23
		% TP53 MSI	4,3%	95,7%	100,0%
		% BAT 26 MSI	25,0%	31,4%	31,1%
		% Total	1,4%	29,7%	31,1%
	Wild type	N	0	1	1
		% TP53 MSI	0,0%	100,0%	100,0%
		% BAT 26 MSI	0,0%	1,4%	1,4%
		% Total	0,0%	1,4%	1,4%
	Total	N	4	70	74
		% TP53 MSI	5,4%	94,6%	100,0%
		% BAT 26 MSI	100,0%	100,0%	100,0%
		% Total	5,4%	94,6%	100,0%

p= 0,93

D2S123 MSI-Polimorfismo Arg72ProTP53

Los 6 pacientes que presentaron D2S123 MSI eran homocigotos mutados para TP53 (Tabla 32).

Tabla 32. Análisis univariante de la relación entre D2S123 MSI y el polimorfismo Arg72Pro TP53.

			Polimorfismo Arg72Pro TP 53			
			Homocigoto mutado	Heterocigoto mutado	Wild-Type	Total
D2S123MSI	Mutado	n	6	0	0	6
		% D2S123 MSI	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
		% TP53	12,0%	0,0%	0,0%	8,1%
		% Total	8,1%	0,0%	0,0%	8,1%
	No mutado	n	44	23	1	68
		% D2S123 MSI	64,7%	33,8%	1,5%	100,0%
		% TP53	88,0%	100,0%	100,0%	91,9%
		% Total	59,5%	31,1%	1,4%	91,9%
	Total	n	50	23	1	74
		% D2S123 MSI	67,6%	31,1%	1,4%	100,0%
		% TP53	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
		% Total	67,6%	31,1%	1,4%	100,0%

p= 0,2

ESTIMACIÓN FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA

1. ANÁLISIS TIEMPO LIBRE DE RECIDIVA

Veinticinco de los 74 pacientes recidivaron, con una mediana de tiempo hasta la recidiva de 8 meses (P25: 5,5- P75: 13,5).

A los 12 meses estaban libres de recidiva 50 pacientes que representan una SLR del 73,3% (EE: 5,3) y a 24 meses, 41 pacientes que representan una SLR 64,1 (EE: 5,8). (Figura 12, Tabla 33).

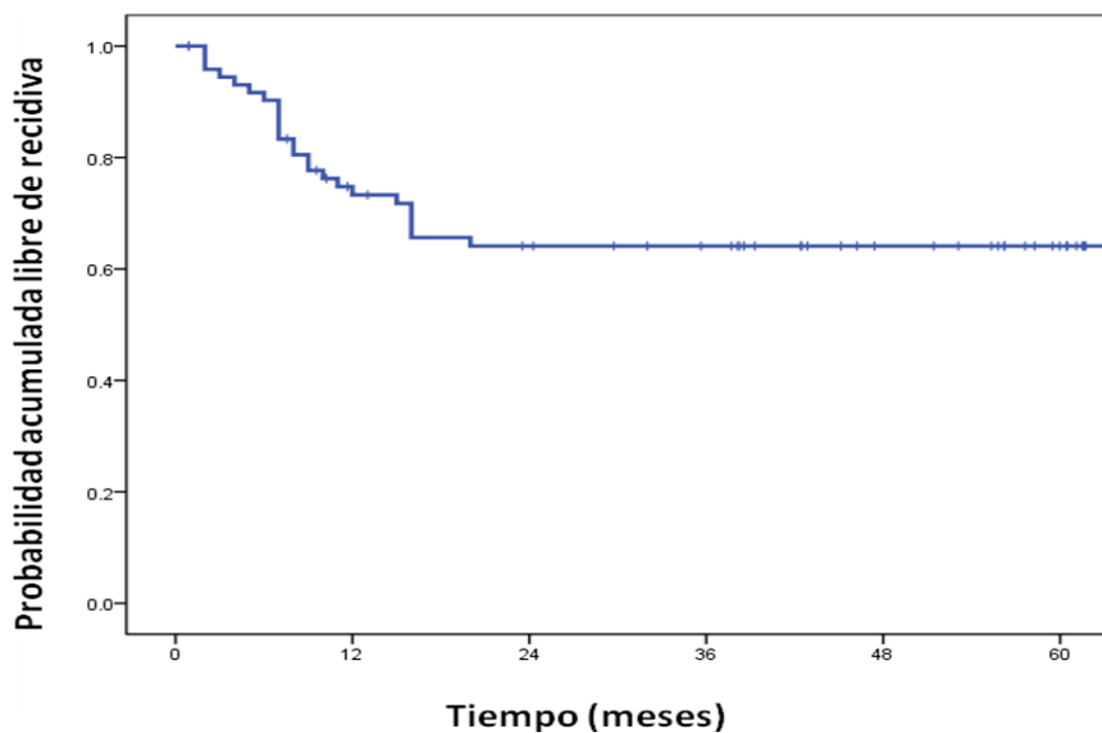


Figura 12. Curva de supervivencia libre de recidiva global.

Relación de los antecedentes personales con la SLR

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la SLR y las variables clínicas analizadas (Tabla 33).

Tabla 33. Análisis de la relación entre la SLR y los antecedentes personales.

	% 12 meses	EE	n	% 24 meses	EE	n	HR	Ic95%	P
Global	73,30	5,30	50,00	64,10	5,80	41,00			
Sexo									0,56
Hombre	70,70	6,00	39,00	63,10	6,40	32,00	1,37	0,47 4,00	
Mujer	84,60	10,00	11,00	69,20	12,80	9,00	1,00	Referencia	
Edad									0,33
Menos de 75	81,80	5,90	34,00	66,90	7,30	27,00	0,67	0,30 1,4	
75 o más	59,70	9,50	16,00	59,70	9,50	15,00	1,00	Referencia	
Consumo tabáquico									0,78
Si	72,40	8,90	19,00	64,30	9,60	16,00	1,14	0,41 3,21	
No	78,90	9,40	14,00	66,80	11,20	11,00	1,00	Referencia	
Ex fumador	70,40	8,80	17,00	62,10	9,50	14,00	1,34	0,48 3,68	
Ingesta hídrica diaria									0,66
1litro o más	72,50	7,80	23,00	63,00	8,50	20,00	1,13	0,51 2,48	
Menos de 1 litro	73,80	7,10	26,00	65,00	7,90	21,00	1,00	Referencia	
Ingesta frutas y verduras									0,10
Alta	86,70	8,80	13,00	80,00	10,30	12,00	1,00	Referencia	
Media	76,00	7,00	27,00	67,50	7,70	24,00	1,63	0,46 5,79	
Baja	56,80	11,60	10,00	42,60	12,30	5,00	3,43	0,94 12,51	

Relación de las variables oncológicas con SLR

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la SLR según el número de RTUs previas, con una HR de 5,13 para los pacientes que habían sido sometidos a 3 o más

RTUs(IC95%: 2,12-12,36) con respecto a los que habían sido sometidos a menos de 3. Figura 13.

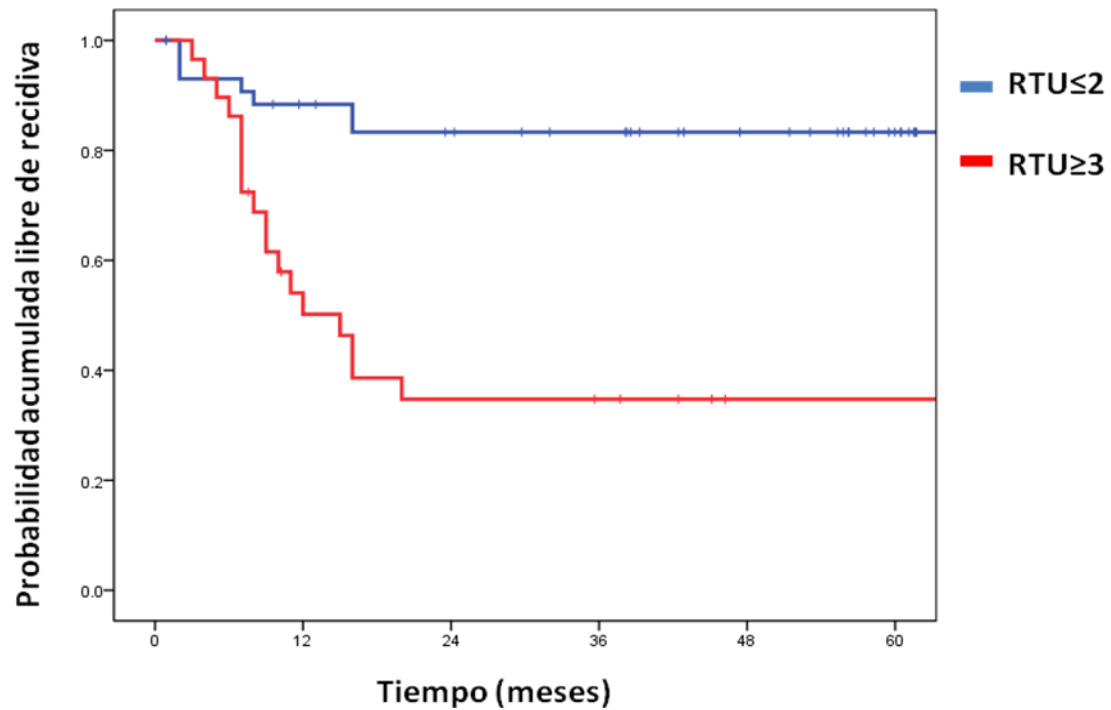


Figura 13. Curva de probabilidad de permanecer libre de recidiva ajustada al número de RTUs previas.

No se obtuvieron diferencias significativas para asociación entre el estadio, grado, uso de MMC o BCG, afectación del TUS con la SLR (Tabla 34).

Tabla 34. Análisis de la relación entre SLR y las variables oncológicas.

		% 12 meses	EE	N	% 24 meses	EE	n	HR	IC95%	P
Estadio										0,65
	Ta	76,50	6,20	34,00	63,90	7,00	28,00	0,82	0,36 1,87	
	T1	67,10	9,60	16,00	62,30	10,00	13,00	1,00	Referencia	
Grado										0,18
	Bajo	78,00	5,60	40,00	68,00	6,40	33,00	1,00	Referencia	
	Alto	58,10	12,10	10,00	51,80	12,40	8,00	1,77	0,76 4,10	
Número RTUs previas										0
	Hasta dos	88,40	4,90	36,00	83,30	5,80	32,00	1,00	Referencia	
	Tres o más	50,20	9,50	14,00	34,80	9,20	9,00	5,13	2,12 12,36	
Mitomicina										0,60
	Si	77,20	6,30	32,00	65,10	7,30	26,00	0,81	0,36 1,80	
	No	67,30	9,00	18,00	63,10	9,40	15,00	1,00	Referencia	
BCG										0,53
	Si	65,60	10,60	13,00	59,70	11,20	10,00	1,31	0,56 3,03	
	No	75,50	6,20	35,00	64,70	6,90	30,00	1,00	Referencia	
Afectación TUS										0,29
	Si	50,00	25,00	1,00	50,00	25,00	1,00	2,18	0,50 9,42	
	No	74,80	5,30	49,00	65,30	5,90	40,00	1,00	Referencia	

Relación de las mutaciones con la SLR

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la SLR de los pacientes que presentaban D2S123 MSI, con una HR de 5,44 para los pacientes que presentaban la mutación (IC95%: 1,83-16,16) con respecto a los que no (Figura 17).

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la SLR con la mutación de KRAS 12 (figura 14), BAT 25 MSI (figura 15), BAT 26 MSI (figura 16), el polimorfismo Arg 72 Pro del gen TP53 y la SLR (Figura 18) (Tabla 35).

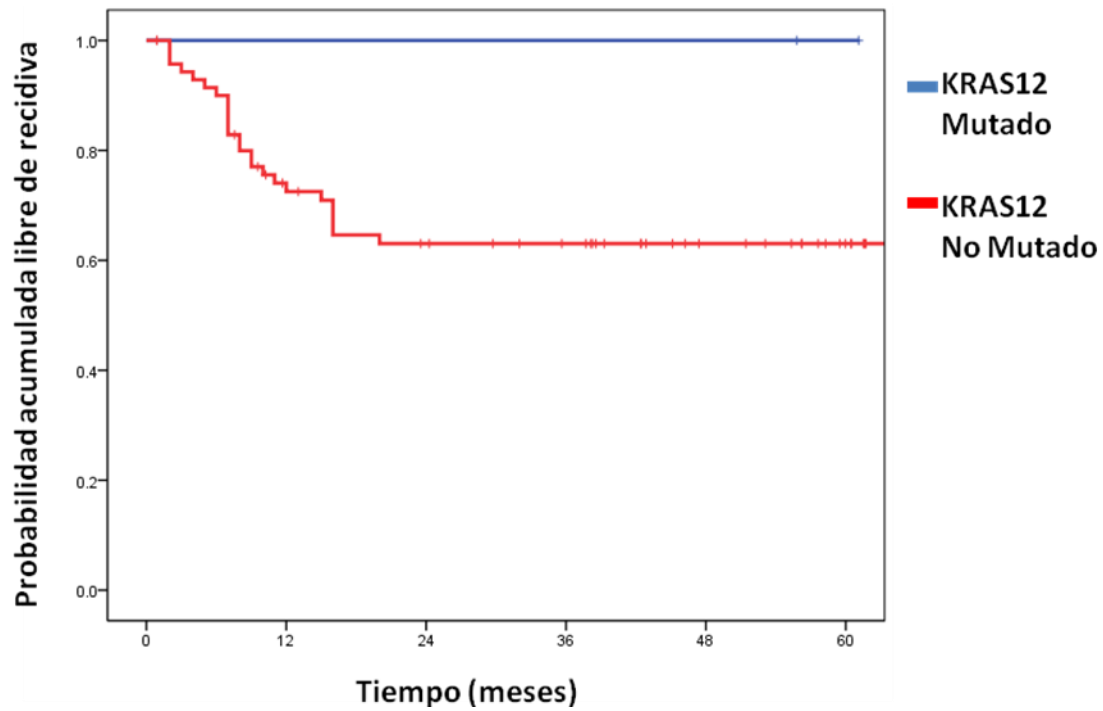


Figura 14. Curva de probabilidad de permanecer libre de recidiva ajustada a la presencia de la mutación KRAS 12.

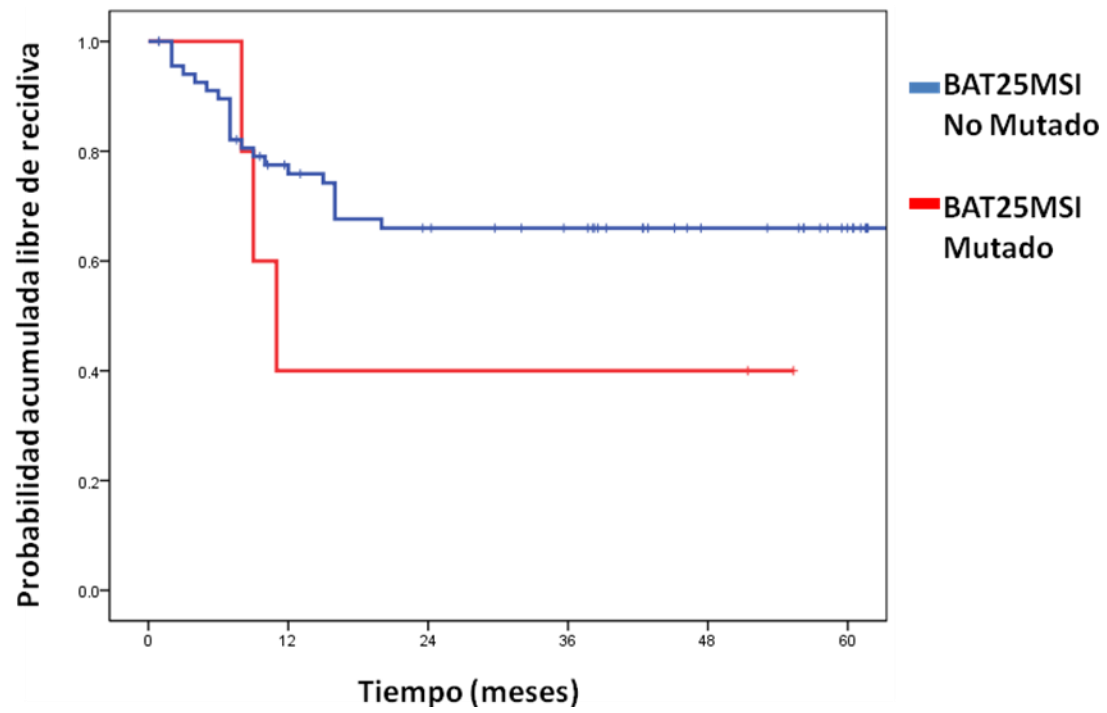


Figura 15. Curva de probabilidad de permanecer libre de recidiva ajustada a la presencia de BAT 25 MSI.

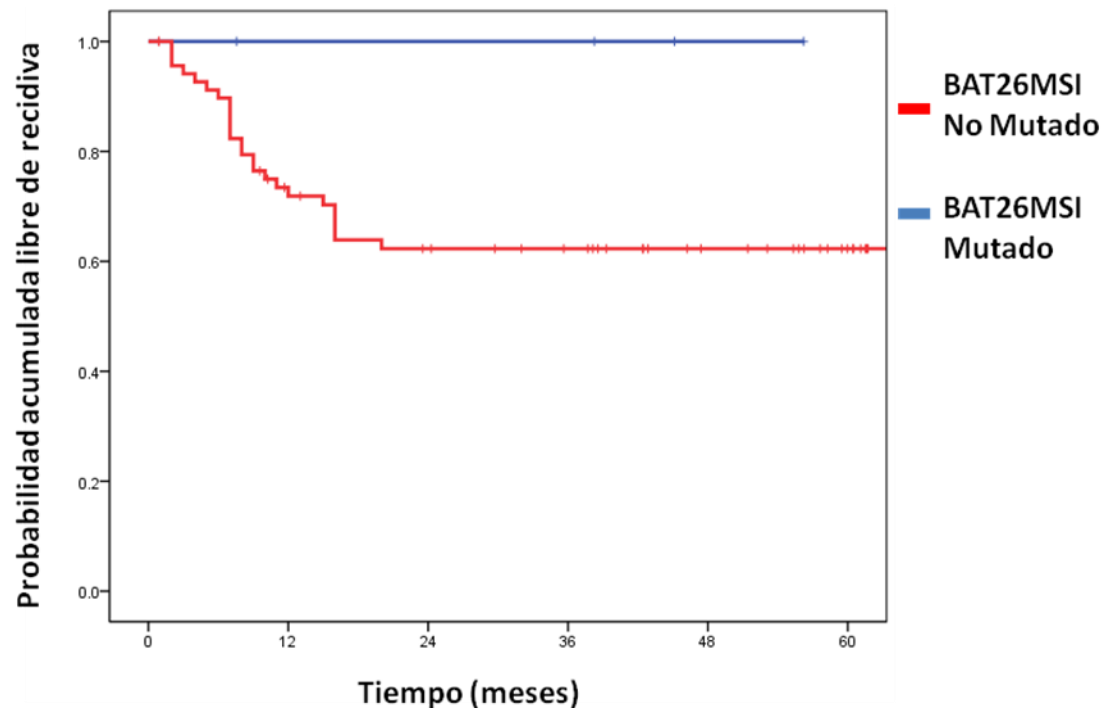


Figura 16. Curva de probabilidad de permanecer libre de recidiva ajustada a la presencia de BAT 26 MSI.

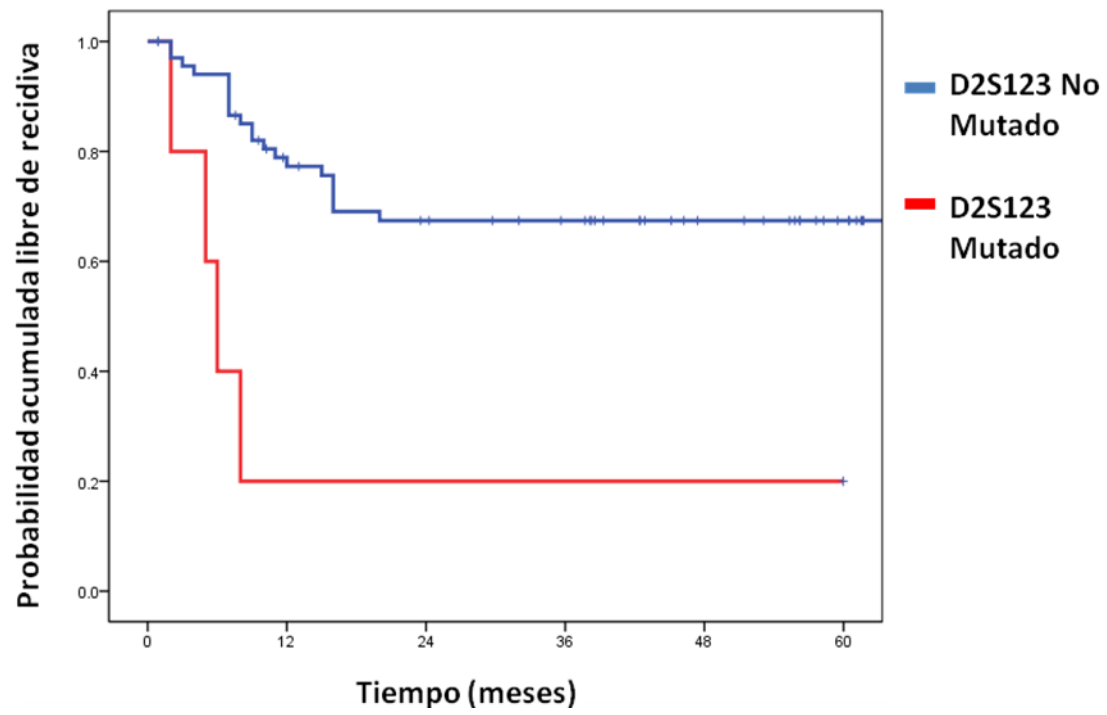


Figura 17. Curva de probabilidad de permanecer libre de recidiva ajustada a la presencia de D2S123 MSI.

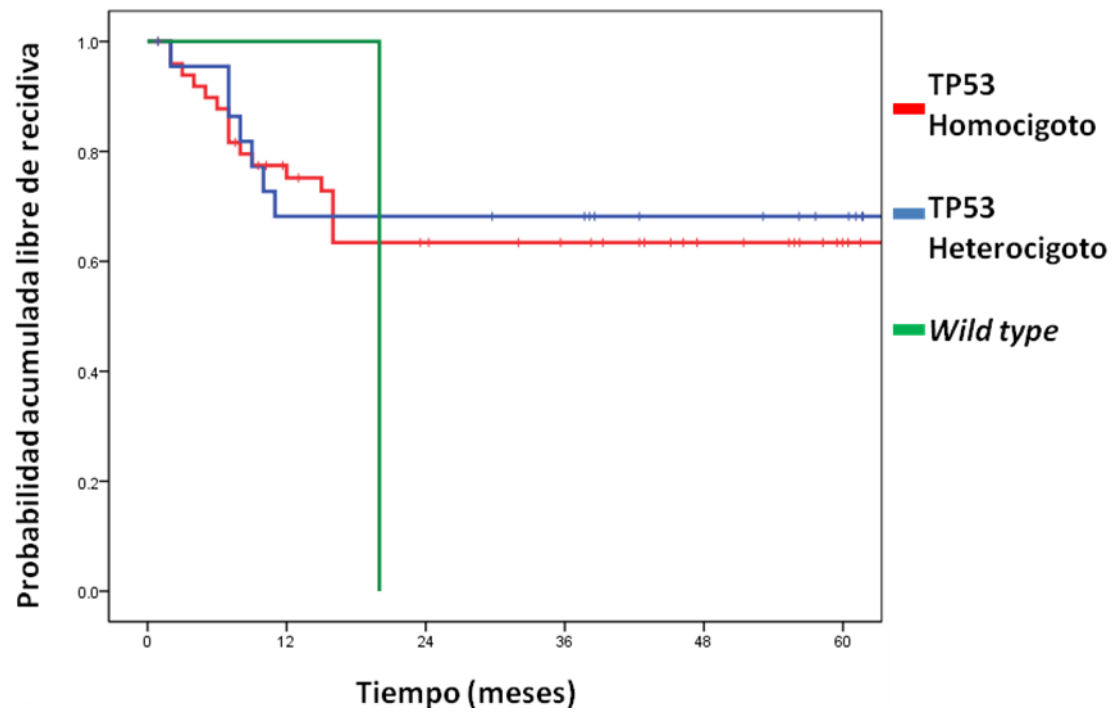


Figura 18. Curva de probabilidad de permanecer libre de recidiva ajustada a la presencia del polimorfismo Arg72Pro del gen TP53.

Tabla 35. Análisis de la relación entre SLR y las diferentes mutaciones.

	% 12 meses	EE	n	% 24 meses	EE	n	HR	Ic95%	P
KRAS 12									0,65
Mutado	100,00	--	--	100,00	--	--	0,05	0,00	--
No mutado	72,90	5,30	49,00	63,60	5,80	40,00	1,00	Referencia	
BAT 25 MSI									0,26
Mutado	40,00	21,90	2,00	40,00	21,90	2,00	1,98	0,59	6,66
No mutado	75,90	5,30	48,00	66,00	5,90	39,00	1,00	Referencia	
BAT 26MSI									0,41
Mutado	100,00	--	--	100,00	--	--	0,04	0,00	71,19
No mutado	71,90	5,50	47,00	62,30	6,00	38,00	1,00	Referencia	
D2S123 MSI									0,00
Mutado	20,00	17,90	1,00	20,00	17,90	1,00	5,44	1,83	16,16
No mutado	77,30	5,20	49,00	67,40	5,90	40,00	1,00	Referencia	
TP53									0,30
Homocigoto mutado	75,20	6,20	34,00	63,40	7,10	26,00	0,44	0,05	3,33
Heterocigoto mutado	68,20	9,90	15,00	68,20	9,90	15,00	0,38	0,04	3,12
No mutado	100,00	--	--	100,00	--	--	1,00	Referencia	

ANÁLISIS TIEMPO LIBRE DE PROGRESIÓN

El tumor progresó en 3 de los 76 pacientes, con una mediana de tiempo hasta la progresión progresión 14 meses (P75: 12).

A los 12 meses estaban libres de progresión 67 pacientes que representan una supervivencia libre de progresión (SLP) del 98,50% (EE: 1,50) y a 24 meses, 60 pacientes que representan una SLP 95,40 (EE: 2,60). Figura 19. Tabla 36.

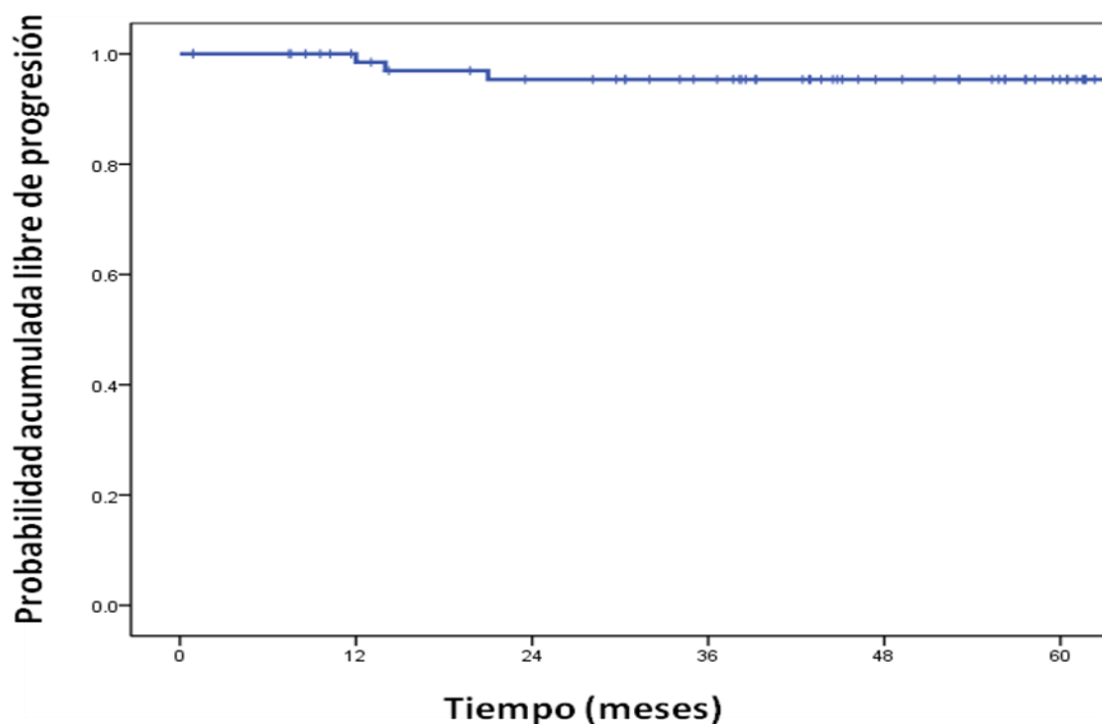


Figura 19. Curva de supervivencia libre de progresión global.

Antecedentes personales

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la relación entre la SLP y las variables sexo, edad, consumo tabáquico, ingesta hídrica e ingesta de frutas y verduras (Tabla 36).

Tabla 36. Análisis de la relación entre la SLP y los antecedentes personales.

	% 12 meses	EE	n	% 24 meses	EE	n	HR	lc95%	p
Global	98,50	1,50	66,00	95,40	2,60	59,00			
Sexo									0,53
Hombre	--	--	53,00	96,10	2,70	48,00	0,46	0,04 5,11	
Mujer	92,30	7,40	12,00	92,30	7,40	12,00	1,00	Referencia	
Edad									0,33
Menos de 75	--	--	41,00	97,50	2,50	37,00	0,30	0,02 3,33	
75 o más	96,00	3,90	25,00	91,80	5,50	22,00	1,00	Referencia	
Consumo tabáquico									0,82
Si	100,00	--	26,00	96,00	3,90	24,00	26231,46,63	0,00 --	
No	100,00	--	18,00	100,00	--	16,00	1,00	Referencia	
Ex fumador	95,70	4,30	23,00	91,10	6,00	19,00	58856,75,99	0,00 --	
Ingesta hídrica diaria									0,50
1litro o más	96,80	3,20	31,00	93,40	4,50	28,00	2,24	0,20 24,74	
Menos de 1 litro	100,00	--	35,00	97,10	2,90	31,00	1,00	Referencia	
Ingesta frutas y verduras									0,69
Alta	100,00	--	14,00	100,00	--	13,00	1,00	Referencia	
Media	97,10	2,80	35,00	91,30	4,80	31,00	58,50	0,00 53575400,79	
Baja	100,00	--	17,00	100,00	--	15,00	1,00	0,00 116659088,32	

Variables oncológicas

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la relación entre la SLP y el estadio, grado, número de RTUs previas, uso de MMC o BCG y afectación del TUS (Tabla 37).

Tabla 37. Análisis de la relación entre la SLP y las variables oncológicas.

		% 12 meses	EE	n	% 24 meses	EE	n	HR	lc95%	p
Estadio										0,48
	Ta	97,70	2,20	44,00	93,20	3,80	40,00	37,56	0,00	985577,49
	T1	100,00	--	22,00	100,00	--	19,00	1,00	Referencia	
Grado										0,56
	Bajo	98,00	1,90	51,00	94,00	3,40	45,00	1,00	Referencia	
	Alto	100,00	--	15,00	100,00	--	14,00	0,03	0,00	3211,59
Número RTUs previas										0,36
	Hasta dos	97,50	2,50	40,00	97,50	2,50	36,00	1,00	Referencia	
	Tres o más	100,00	--	26,00	92,10	5,30	23,00	3,02	0,27	33,39
Mitomicina										0,92
	Si	100,00	--	42,00	95,10	3,40	38,00	1,12	0,10	12,46
	No	96,00	3,90	25,00	96,00	3,90	21,00	1,00	Referencia	
BCG										0,51
	Si	100,00	--	18,00	100,00	--	16,00	0,02	0,00	1128,73
	No	97,80	2,20	46,00	93,40	3,70	41,00	1,00	Referencia	
AfectaciónTUS										0,52
	Si	100,00	--	3,00	100,00	--	3,00	0,03	0,00	--
	No	98,40	1,60	64,00	95,20	2,70	57,00	1,00	Referencia	

Mutaciones

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la relación entre SLP y la mutación de KRAS 12 (figura 20), BAT 25 MSI (figura 21), BAT 26 MSI (figura 22), D2S123 MSI (figura 23) y el polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 (figura 24). Tabla 38.

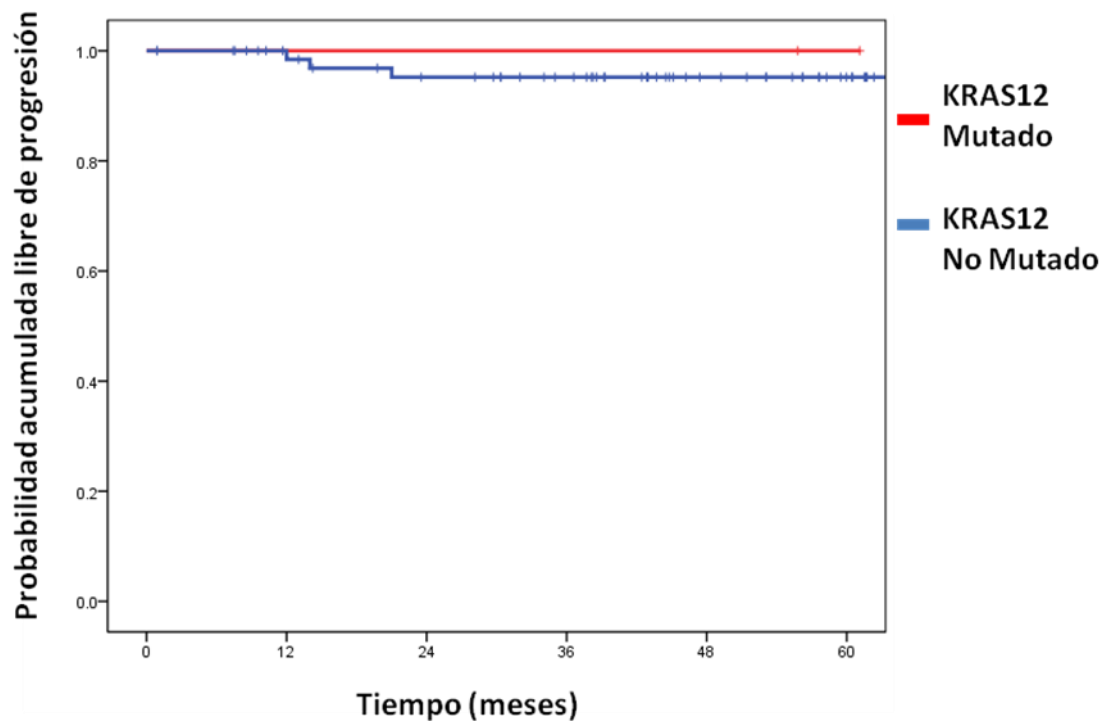


Figura 20. Curva de probabilidad de permanecer libre de progresión ajustada a la presencia de la mutación en KRAS12.

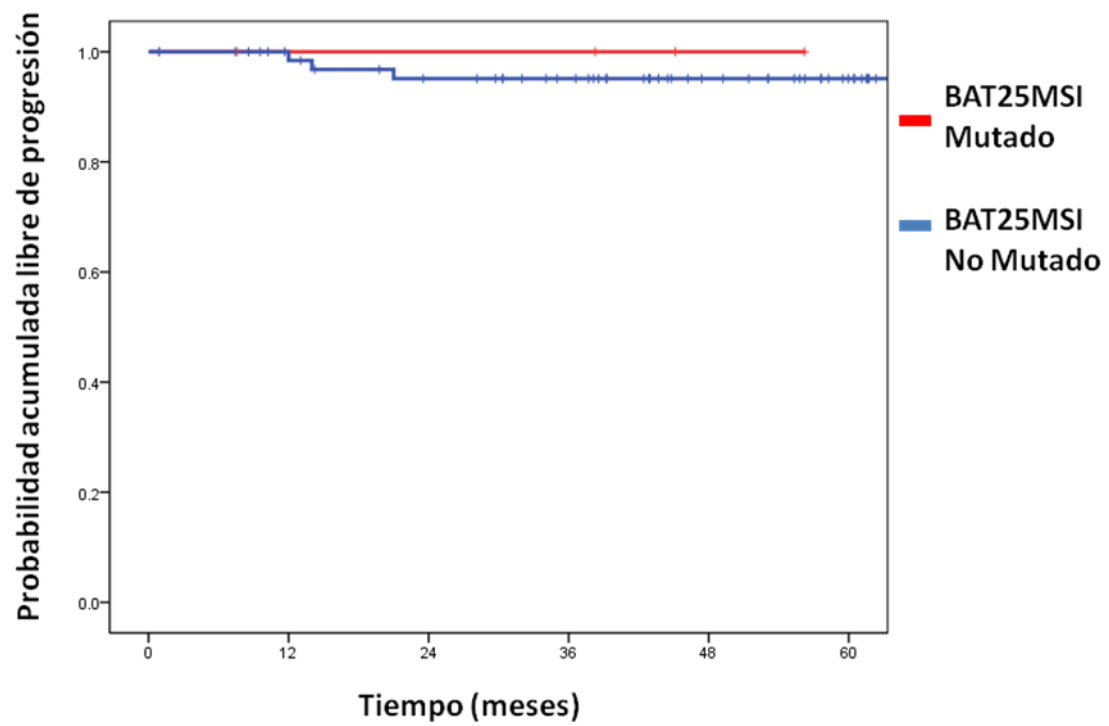


Figura 21. Curva de probabilidad de permanecer libre de progresión ajustada a la presencia de BAT 25 MSI.

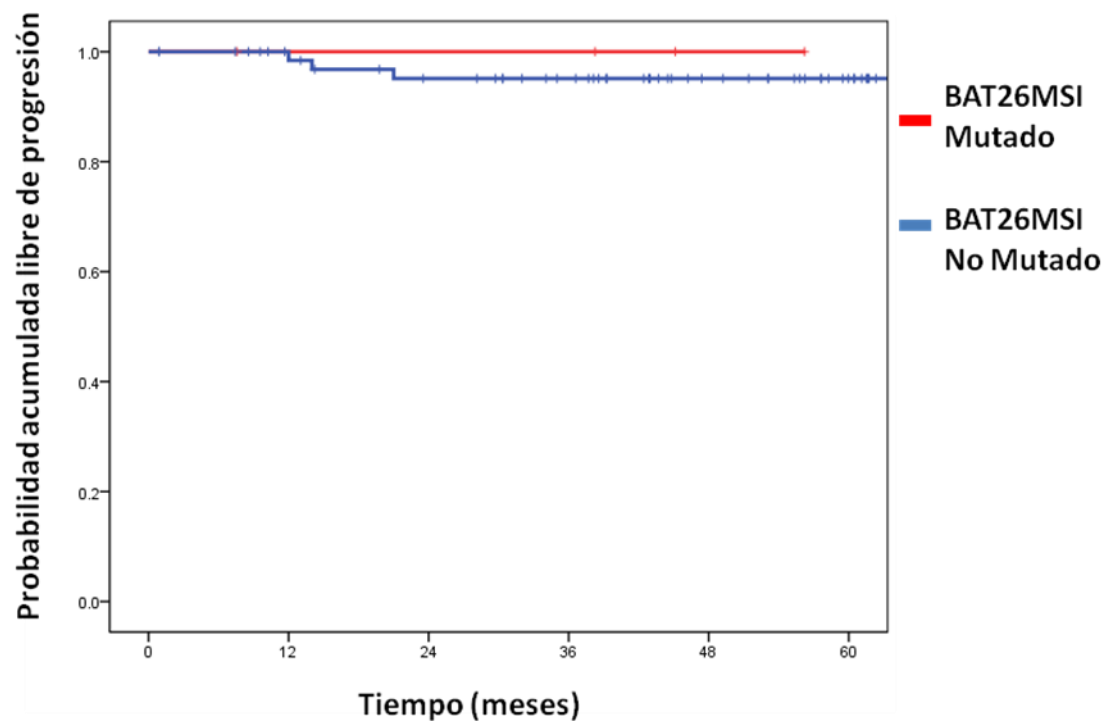


Figura 22. Curva de probabilidad de permanecer libre de progresión ajustada a la presencia de BAT 26 MSI.

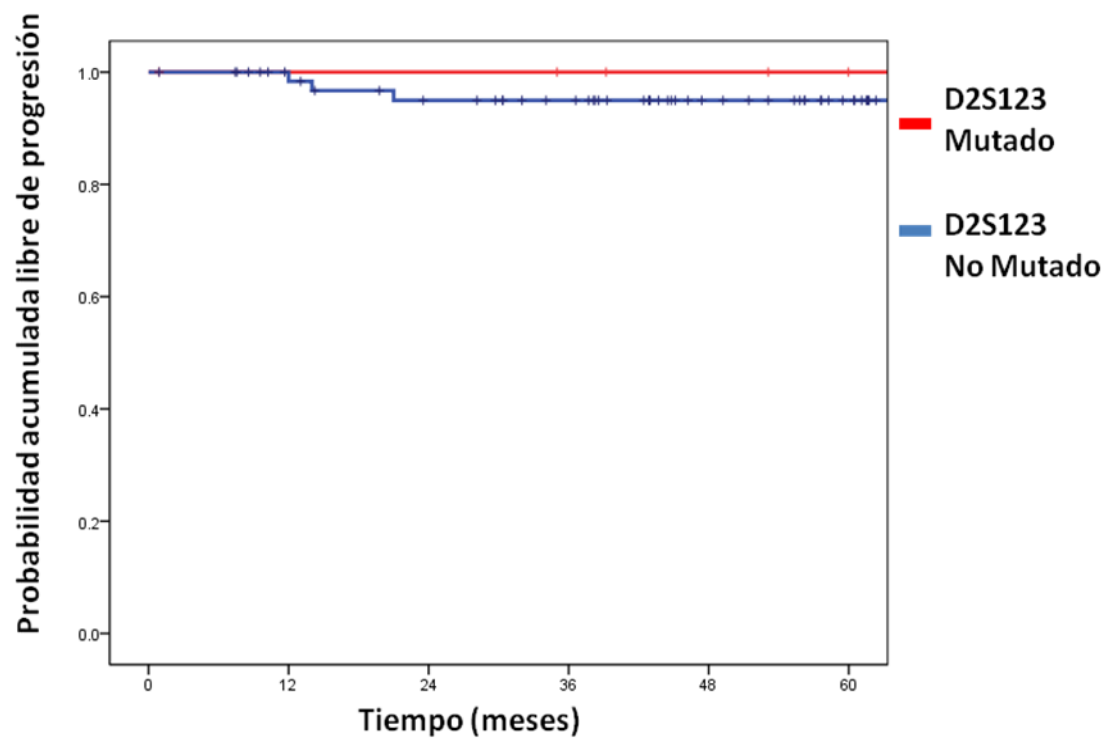


Figura 23. Curva de probabilidad de permanecer libre de progresión ajustada a la presencia de D2S123 MSI.

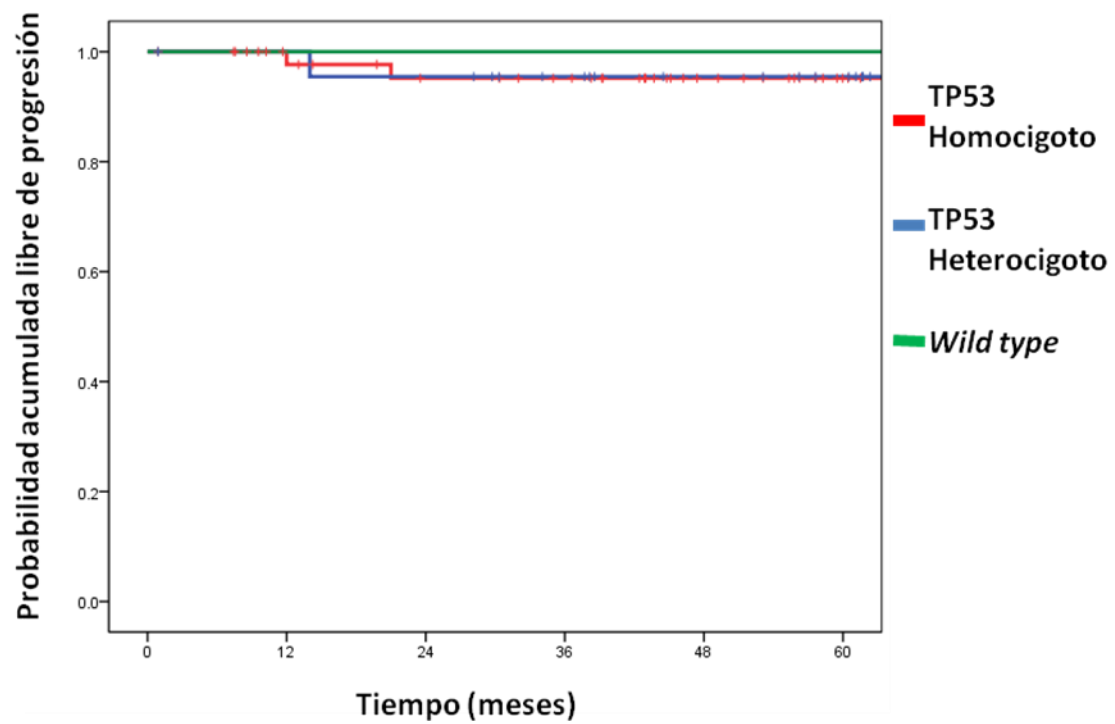


Figura 24. Curva de probabilidad de permanecer libre de progresión ajustada a la presencia del Polimorfismo Arg72Pro del gen TP53.

Tabla 38. Análisis de la relación entre la SLP y las diferentes mutaciones.

	% 12 meses	EE	n	% 24 meses	EE	n	HR	Ic95%	p
KRAS 12									0,88
Mutado	100,00	--	1,00	100,00	--	1,00	0,04	0,00	--
No mutado	98,50	1,50	65,00	95,30	2,70	58,00	1,00	Referencia	
BAT 25 MSI									0,75
Mutado	100,00	--	4,00	100,00	--	4,00	0,04	0,00	--
No mutado	98,40	1,60	61,00	95,00	2,80	55,00	1,00	Referencia	
BAT 26MSI									0,80
Mutado	100,00	--	3,00	100,00	--	2,00	0,04	0,00	--
No mutado	98,40	1,60	63,00	96,80	2,20	56,00	1,00	Referencia	
D2123 MSI									0,74
Mutado	100,00	--	5,00	100,00	--	5,00	0,04	0,00	--
No mutado	98,40	1,60	61,00	95,00	2,80	54,00	1,00	Referencia	
TP53									0,99
Homocigoto mutado	97,70	2,3	43,00	95,20	3,30	37,00	3116,60	0,00	--
Heterocigoto mutado	100,00	--	22,00	95,50	4,40	21,00	2946,88	0,00	--
No mutado	100,00	--	1,00	100,00	--	1,00	1,00	Referencia	

ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Dado que sólo se objetivaron diferencias en cuanto a la recidiva, se evaluaron sólo factores pronósticos en la SLR.

El estudio multivariable se ha realizado mediante el modelo de Cox, evaluando las variables independientes en relación a la SLR.

En este modelo, para valorar el efecto de cada variable en presencia del resto de covariables sobre la SLR, utilizamos la recidiva (presente o ausente) como variable

dependiente, y las variables oncológicas (número de RTUs previas, estadio y grado) y el estado de D2S123 MSI como variables pronósticas o independientes.

De esta forma, encontramos diferencias estadísticamente significativas para mayor riesgo de recidiva en los pacientes con D2S123 MSI positivo (HR: 5,15; p: 0,004) y un número de RTUs previas mayor a 2 (HR: 5,07; p:0,00) ajustados al estadio y grado.

Para medir la capacidad de discriminación del modelo, es decir, la capacidad del modelo para asignar el resultado correcto a un par de sujetos elegidos al azar, permitiendo distinguir entre los que desarrollarán el evento y los que no lo harán, hemos utilizado el índice C de Harrel.

Este índice, señala cómo de eficaz es el modelo de predicción discriminando a los individuos que realizan el evento frente a los individuos que no lo realizan para datos con observaciones censuradas.

Se evidenció una capacidad del modelo para discriminar qué pacientes sufrirán recidiva, con un índice de C de Harrell del 0,74 (p <0,001), es decir, los pacientes que presenten D2S123 y hayan sido sometido a más de 2 RTUv tendrán una probabilidad de recidivar del 0,74 frente a los que no presenten la mutación y hayan tenido más de 2 recidivas previas.

Tabla 39. Modelo multivariante de Cox

		Hazard ratio (Razón de tasas)	IC95,0% HR		P
			Inferior	Superior	
Modelo completo	D2123MSI	5,440	1,560	18,971	,008
	> 2 RTUv previas	4,664	1,866	11,660	,001
	Estadio (pT)	,677	,162	2,829	,593
	Grado	1,569	,378	6,519	,536
Modelo final	D2123MSI	5,157	1,669	15,934	,004
	> 2 RTUv previas	5,070	2,087	12,318	,000

Estadístico de discriminación del modelo (Índice C de Harrell) 0,74 p<0,001

Dado que el estadio es un factor de riesgo para la recidiva reconocido en la literatura y podría ser un factor de confusión al analizar el peso de D2S123 MSI en el riesgo de recidiva se realizó un análisis ajustando por estadio, pTa o pT1.

Al estratificar el análisis por estadios, se observaron diferencias estadísticamente significativas para la presencia de D2123 MSI y los tumores papilares pTa ($p<0,05$) frente a los pT1, en los que la presencia del biomarcador no fue significativa. Tabla 40.

Tabla 40. Modelo multivariante ajustado para el estadio.

Estadio			HR (razón de tasas)	IC 95,0% HR		P
				Inferior	Superior	
pT1	Paso 1	D2123MSI	4,090	,934	17,918	,062
		> 2 RTUv previas	3,272	,601	17,820	,171
		G	1,395	,214	9,095	,728
	Paso 2	D2123MSI	4,052	,942	17,429	,060
		> 2 RTUv previas	3,885	,926	16,306	,064
		G	2,477	,312	19,659	,391
pTa	Paso 1	D2123MSI	12,078	1,070	136,295	,044
		> 2 RTUv previas	5,738	1,803	18,261	,003
		G	2,477	,312	19,659	,391
	Paso 2	D2123MSI	11,279	1,009	126,028	,049
		> 2 RTUv previas	5,580	1,764	17,648	,003
		G	2,477	,312	19,659	,391

DISCUSIÓN

JUSTIFICACIÓN

Los tumores uroteliales de vejiga engloban un conjunto de neoplasias con un comportamiento muy diferente en cuanto a su evolución clínica. Los TVMI representan el 20% de los CCT, estos exigen un tratamiento radical inmediato por su capacidad para comprometer la supervivencia del individuo. Los TVNMI representan el 80% restante y tienen un carácter eminentemente recidivante (40-80% presentan recidivas locales) pudiendo progresar en grado y estadio entre un 10-20%. Existen así dentro de los TVNMI, dos grupos bien diferenciados en cuanto a riesgo de recidiva y progresión, exigiendo por tanto un tratamiento y seguimiento que difiere mucho entre ambos

Para intentar predecir el riesgo de recurrencia y progresión la European Organization for Research and Cancer Trials (EORTC) ha creado unas tablas de riesgos basadas en 6 factores clínicos y patológicos: número de tumores, tamaño, recurrencias previas, categoría T, presencia de *cis* y grado. Tablas 4 y 5.(33)

En el grupo de bajo riesgo estarían aquellos pacientes con un tumor primario, único, menor de 3cm, pTaG1 y sin presencia de *cis* asociado. En el de alto riesgo, estarían aquellos tumores T1G3, múltiples, recurrentes, mayores de 3cm y con *cis* asociado. En el grupo intermedio estarían todos aquellos que no se encontrasen en ninguno de los dos grupos anteriores.

Según esto, la probabilidad de recurrencia serían del 24 al 61% al año y del 46 al 78% a los 5 años, y de progresión del 1 al 17% al año y del 6 al 45% a los 5 años.

Aunque la cistoscopia es considerada el gold-standard en el diagnóstico y seguimiento, es un método invasivo que además puede pasar por alto los tumores planos como el carcinoma *in situ*.

Las citologías de orina tienen una media de sensibilidad del 35% y una especificidad del 94%. Aunque estas cifras mejoran en los tumores de alto grado, su limitación fundamental es la baja sensibilidad en tumores de bajo grado.(43)

Estas limitaciones hacen muy interesante la investigación en métodos diagnósticos no invasivos, con el fin de mejorar la precisión diagnóstica y evitar las molestias que generan a los pacientes este tipo de pruebas. Desde esta perspectiva, consideramos muy interesante la posibilidad de utilizar biomarcadores que diferencien entre tumores con mayor capacidad de progresar o recidivar, de forma que se puedan ahorrar pruebas a pacientes, con el coste económico y de calidad de vida que ello conlleva, o hacer seguimientos más estrechos a otros.

DISEÑO DEL ESTUDIO

El aumento de los conocimientos en biología molecular ha facilitado el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y de seguimiento.

La idea de marcador tumoral surge como consecuencia de la necesidad clínica de poder contar con indicadores biológicos de la existencia de un cáncer y que a su vez, puedan ser utilizados durante el seguimiento para diagnosticar recidiva y/o progresión. El marcador tumoral ideal no existe a día de hoy, pero debería reunir las siguientes características: ser producido exclusivamente por tejido maligno, ser fácilmente medible y reproducible, ser capaz de detectar una mínima cantidad de tumor, ser menos costoso que los medios habituales de diagnóstico y tener alta sensibilidad y especificidad. (42) (46).

Es por ello por lo que nos planteamos que el uso de biomarcadores podría servir para identificar qué TVNMI tendrían mayor capacidad de recidivar o de progresar.

Escogimos TVNMI de riesgo intermedio o alto según los criterios de la EAU porque en estos dos subgrupos la frecuencia de eventos, tanto recidiva como progresión, es mayor, pasando de una frecuencia de recidiva del 15% (IC 95%: 10-19) al año para los TVMNI de riesgo bajo a

entre el 24 (IC 95%: 21-26) y el 61% (IC 95%: 55-67%) para los de riesgo intermedio y alto. En cuanto al riesgo de progresión, pasa del 0,2% (IC 95%: 0-0,7) en los TVNMI con menor riesgo, al 17% (IC 95%: 10-24) en aquellos TVNMI de riesgo más elevado (33).

A nivel molecular, a día de hoy conocemos que los tumores superficiales no invasivos se caracterizan por mutaciones “ganancia de función” que afectan a oncogenes como RAS, FGFR3 y PI3 K y por deleciones en el brazo largo del cromosoma 9 (9q); mientras que los tumores de alto grado asocian inestabilidad genética, aneuploidia y alteraciones de genes supresores de tumores como TP53.(149) (150) (151) (152)

Por este motivo los escogidos fueron 3, el oncogen KRAS, la inestabilidad de microsatélites BAT25 MSI, BAT26MSI y D2S123, y el oncogen TP53:

- Oncogen KRAS: miembro de una familia de *GTP binding proteins* de bajo peso molecular que actúan como transductores de señales dependientes de los receptores de la tirosin kinasa entre los que se incluye el EGFR. Esto conlleva que mientras en la forma KRAS *wild type* después de la activación del receptor EGFR sea activa durante un periodo corto de tiempo a través de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK); en la forma mutada, esté continuamente activada haciéndose independiente de los receptores de la tirosin kinasa.

La frecuencia de mutaciones en KRAS en el cáncer de vejiga va del 4,2 al 11% encontrándose el 90% de las mutaciones en el codón 12 (54) (86). En base a ello pensamos que su mutación podría tener relación con los TVNMI.

Respecto al método de detección de esta mutación hemos utilizado la amplificación con PCR y la secuenciación directa, que aunque tiene como desventaja su coste, es el método considerado “gold-standard” por la totalidad de autores (54).

- Gen supresor de tumores TP53: El gen p53 codifica para la síntesis de la proteína p53 que actúa sobre la proteína p21, inhibiendo la fosforilación de la pRb. Con este

mecanismo, el gen *p53* permite la reparación del DNA anómalo (a través de múltiples genes reparadores como *MLH1* y *MLH2*, entre otros) (57) y, en caso contrario, se provoca la detención del ciclo celular y provoca la entrada de la célula en G0, o bien su muerte por apoptosis (58).

Las alteraciones en el gen *p53* inducen una proteína incapaz de realizar su función de reparación de los daños producidos en el DNA por lo que se reduce la actividad transcripcional de modo parcial o completo y se impide el control de la proliferación y la muerte celular programada, convirtiéndola en una célula de crecimiento incontrolado.

Es por ello que pensamos que aunque existen disparidad de resultados en los diferentes estudios y metaanálisis revisados, que van desde la ausencia de asociación con el cáncer de vejiga hasta estudios que afirman que algunas variantes heterocigotas podrían comportarse como factor protector (66–70), en la mayoría de estudios sobre los TVNMI se ha asociado a un peor pronóstico por su mayor facilidad para progresar en grado y estadio(57)(65)(69) (71), empeorando el pronóstico de aquellos pacientes de nuestra serie que presentasen la mutación. La frecuencia de esta mutación en el cáncer vesical es de en torno al 50% (67).

En el análisis del polimorfismo se utilizó PCR-RLFP usando una enzima de restricción y separación de fragmentos en gel de agarosa, con comprobación mediante secuenciación directa posterior, que es el método usado en la mayoría de las series publicadas.

- Inestabilidad de microsatélites: Los microsatélites son secuencias de repeticiones de mono a pentanucleótidos que se encuentran en el genoma humano y cuya función se desconoce (aunque se ha hipotetizado que pueda ser reparadora) y que son

susceptibles de sufrir mutaciones durante la replicación del DNA, y el fallo en la reparación de esas mutaciones se traduce en la inestabilidad de los microsatélites.

Los MSI son debidos a una deficiente reparación del DNA y son una repetición de mono y dinucleótidos como son el caso de BAT 25, BAT26 y D2S123 (75)

Los tumores aparecen más que por mutaciones puntuales por acumulación de múltiples eventos genéticos. En este contexto tomamos los MSI como un marcador más de inestabilidad genética que hiciera posible una predisposición a la recidiva/progresión.

La inestabilidad en estos microsatélites se ha reportado en el cáncer vesical en una frecuencia que va del 1% al 72%. Además de esta disparidad de frecuencias, los estudios tampoco son consistentes entre sí en cuanto a su asociación con determinadas características ni demográficas ni oncológicas (76) (77) (153).

Respecto al método de detección de los microsatélites hemos utilizado la amplificación de la secuencia mediante PCR convencional y la secuenciación directa por ser el método más ampliamente utilizado y que sigue los criterios establecidos por el *National Cancer Institute*.

Diseñamos un estudio en una cohorte de pacientes afectados por un TVNMI con las características previamente descritas a los que se les estudiaron los diferentes biomarcadores y se les realizó prospectivamente, para evaluar qué pacientes recidivaban y cuáles progresaban. Los pacientes se seleccionaron de manera consecutiva durante un periodo de tiempo, presentando todos un riesgo intermedio y alto para la recidiva y la progresión, para de esta forma obtener eventos en el menor tiempo de seguimiento posible, al maximizar la probabilidad de recidiva y progresión.

A la hora de escoger las variables hemos intentado predecir el riesgo de recurrencia y progresión con las tablas de riesgos de la EORTC basadas en 6 factores clínicos y patológicos: número de tumores, tamaño, recurrencias previas, categoría T, presencia de cis y grado.

En el estudio de la EORTC sobre pacientes de riesgo intermedio y alto sin cis asociado que habían recibido instilaciones de BCG entre 1 y 3 años, se encontró que la recurrencia previa y el número de tumores eran los factores de pronóstico más importantes para la recurrencia; el estadio y el grado los factores pronósticos más importantes para la progresión y la supervivencia cáncer específica; y la edad y el grado los factores pronósticos más importantes para la supervivencia global (37). Por ello analizamos estas variables clínicas y anatomopatológicas.

Además se analizó el sexo y el hábito tabáquico, al ser un tumor más frecuente en hombres y en fumadores (4), y se estudió el consumo de agua y la influencia de la dieta ante la posible influencia de la nutrición y los hábitos de vida postulado por algunos autores (154).

Inicialmente es un estudio focalizado en el análisis de recidivas, al ser un evento mucho más frecuente, lo cual permite obtener conclusiones con un tiempo de seguimiento menor. No obstante, decidimos también analizar la progresión a sabiendas de que era complicado obtener diferencias con un tamaño tan limitado de la serie.

La ausencia de grupo control es una limitación del estudio. Se descartó su creación por consideraciones éticas, ya que no encontramos el modo de obtener biopsias vesicales en personas sanas sin aumentar el riesgo de morbilidad.

METODOLOGÍA CLÍNICA, BIOMARCADORES Y ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Factores demográficos, clínicos y tumorales

La mediana de tiempo de seguimiento de nuestra serie fue de 46,81 meses (RIQ: 32,51-61,70), tiempo suficiente para el desarrollo de eventos, ya que la probabilidad de recurrencia a los 5 años va del 46 (IC 95%: 42-49) al 78% (IC 95%: 73-84) y de progresión del 6 (IC 95%: 5-8) al 45% (IC 95%: 35-55). (33)

La edad media de la muestra fue de 70,72 años (DE: 10,92) y la distribución por sexos fue de 61 hombres (82,4) y 13 mujeres (17,6%), siendo estos datos coincidentes con los estudios epidemiológicos donde se observa un aumento de la incidencias con la edad, sobre todo a partir de los 65 años, y una mayor incidencia en varones (1)(2)(3)(4).

Veintinueve pacientes (39,2%) eran fumadores activos y 31 (41,9%) eran ex fumadores. Esta alta frecuencia de fumadores y exfumadores es fácil de comprender en cuanto a que la asociación entre el tabaquismo y el cáncer urotelial de vejiga ha sido ampliamente descrita, con un riesgo atribuible poblacional del 50% en hombres y del 52% en mujeres y un riesgo relativo del 4,06% (95%CI, 3.66-4.50) combinando ambos sexos (5). Estas cifras son el reflejo de la prevalencia de tabaquismo hace 20 o 30 años en nuestro país, ya que encuestas de salud reflejan que el 63% de los hombres eran fumadores en 1978 (155). El tipo de tabaco consumido en nuestra serie fue fundamentalmente rubio en 31 pacientes (41,9%) y negro en 28 pacientes(37,8%) sin que haya estudios poblacionales en la literatura que demuestren que uno u otro tipo de tabaco es más carcinogénico.

Asimismo la distribución del consumo diario de agua en la muestra fue muy homogéneo, siendo los que bebían un litro o más 33 pacientes (44,6%) y menos de un litro 41 pacientes (55,4%), aunque existen hipótesis acerca de si una menor ingesta hídrica produce una orina

más concentrada y por lo tanto más irritante para la vía urinaria, no se ha demostrado una relación causa efecto con el desarrollo de tumores vesicales.

Dentro del estilo de vida saludable que se ha hipotetizado que puede prevenir algunos tipos de tumores (154), analizamos el consumo diario de frutas y verduras, siendo alto en el 20,3%; medio, en el 54,1%; y bajo en el 25,7%. En la revisión de la literatura tampoco se ha encontrado una asociación causal respecto al nivel de consumo de frutas y verduras y la aparición o no de TVNMI, así como de la recidiva o progresión de los mismos.

Analizamos el número de RTUs previas a la RTUv en la que obtuvimos la muestra para su análisis siendo 45 pacientes (60,8%) los sometidos a dos resecciones o menos (33 pacientes fueron sometidos a una RTUv y 12 a dos RTUv), y 29 pacientes (39,2%) los sometidos a 3 o más RTUs. Consideramos importante que la muestra fuera homogénea en este aspecto ya que cuanto más recidivante sea un tumor más alteraciones genéticas puede acumular, pudiendo afectar al resultado, y porque como señalamos antes, el número de recidivas es uno de los factores más influyentes para la recurrencia. En nuestra serie sí observamos que la recurrencia previa era un factor pronóstico para la recidiva (33), no encontrando asociación al resto de variables.

Cuarenta y cuatro pacientes (59,5%) recibieron instilaciones con MMC posteriormente a la RTU, y 21 (28,4%) con BCG, de acuerdo a las recomendaciones de las guías EAU, con el objetivo de disminuir la probabilidad de recidiva y/o progresión. El número de pacientes que recibió instilaciones de MMC fue mayor de lo que cabría esperar para una serie de tumores de riesgo intermedio y alto, probablemente por tratarse de una población añosa y con comorbilidades (156), ya que produce menos efectos secundarios locales que la BCG (30% con MMC vs 44 % con BCG), y sistémicos (12% con MMC vs 19% con BCG).

Respecto a la distribución de mutaciones, 1 paciente (1,31%) presentó mutación en KRAS 12 y ninguno en KRAS 13. Ésta frecuencia observada es más baja que en las series reportadas en la literatura, donde la frecuencia de mutaciones en KRAS en el cáncer de vejiga va del 4,27% al 11%, encontrándose el 90% de las mutaciones en el codón 12 y el 70% en tumores músculo-invasivos, aunque sin asociación estadísticamente significativa. En tumores colorrectales en sí se halló una asociación con los de moderada diferenciación (52), pudiendo deberse la frecuencia más baja de la mutación en nuestra serie a factores ambientales o étnicos.

Kompier et al. encontraron una frecuencia del 11% de mutaciones en la familia de genes RAS y sin que hallase asociación con la supervivencia libre de recurrencia, progresión o cáncer específica (86).

El polimorfismo Arg 72 Pro del gen TP53 fue la mutación más ampliamente encontrada en nuestra serie, siendo homocigotos mutados 50 pacientes (67,6%), heterocigotos mutados 23 (31,1%) y no mutados, solamente un paciente (1,4%). Estos resultados son consistentes con la literatura encontrándose frecuencias del 25 al 50% en las distintas series (67) (68) (157), si bien probablemente en nuestra serie hay más frecuencia de este polimorfismo al habernos centrado sólo en pacientes de riesgos intermedios y altos.

En cuanto a MSI, 5 pacientes (6,8%) presentaron mutación en BAT 25, 4 (5,26%) en BAT 26 y 6 (8,1%) en D2S123 lo que representa una frecuencia dentro del amplio rango de frecuencia de las series publicadas que van del 1 al 45% (78) (143) (153) (158).

ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS

KRAS 12 y 13

Un (1%) paciente presentó la mutación en KRAS 12 en nuestra serie y ninguno en KRAS 13.

No encontramos asociación estadísticamente significativa entre la mutación en KRAS 12 y 13 y las diferentes variables demográficas, clínicas y oncológicas. Esto posiblemente fuese debido a los pocos pacientes que presentaron la mutación. Aunque hay series en la literatura que reportan frecuencias de esta mutación de hasta el 11% otras son más bajas pudiendo reflejar las diferentes frecuencias de su aparición la influencia de series cortas, diferencias étnicas o métodos de análisis diferentes para detectar la mutación (55) (56).

Querhane et al. analizaron una serie de 234 pacientes, de los cuales el 70% eran TVMI, encontrando un 90% de mutaciones en el codón 12, aunque sin asociación estadísticamente significativa(52). Kompier et al. analizaron 19 mutaciones de 257 tumores primarios y 184 recurrencias de una serie 54 pacientes, encontrando un 11% de mutaciones en la familia de genes RAS y sin que hallase asociación con la supervivencia libre de recurrencia, progresión o cáncer específica (86). Ninguna de las series antes mencionadas aportó su tiempo de seguimiento.

Polimorfismo Arg72Pro del gen TP53

Cincuenta pacientes (67,6%) fueron homocigotos mutados, 23 pacientes (31,1%) fueron heterocigotos mutados, y 1 paciente (1,4%), no presentaban la mutación.

Existen múltiples estudios que tratan de determinar la asociación entre el cáncer de vejiga y el polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 pero los resultados son contradictorios debido a las

muestras pequeñas de pacientes estudiados y a las diferentes formas del procesado de la muestra.

En un metaanálisis de 5500 sujetos Liu et al (66) el polimorfismo no se asoció de manera significativa al cáncer de vejiga. En el subgrupo de análisis por etnias, se asoció al aumento de riesgo en asiáticos pero no en la raza caucásica, demostrándose una asociación del polimorfismo a la raza.

En nuestro estudio, encontramos una asociación estadísticamente significativa entre este polimorfismo y el estadio tumoral, no encontrando asociación con ninguna de las variables demográficas, clínicas ni con el resto de oncológicas. De los heterocigotos mutados 20 pacientes (87%) fueron Ta, y solamente 3 pacientes (13%) T1, mientras que en los homocigotos mutados, 28 pacientes (56%) fueron Ta y 22 (44%) T1. Si bien otros autores sugieren que esta asociación podría estar influenciada por la edad, género o el hábito tabáquico (68), ha sido reportada en estudios previos, como Pandith et al. que en un estudio de casos y controles encontraron una asociación entre el polimorfismo, tumores más avanzados y varones fumadores ($p < 0,05$) (157). A diferencia de esto, no encontramos asociación estadísticamente significativa entre estos polimorfismos y el grado tumoral.

Pandith et al realizaron un estudio con 108 casos y 138 controles y observaron una asociación entre el polimorfismo y los pacientes con CCT en una población de una región india, con una OR: 2,9 (95%CI: 1,5-4,5) (157); sin embargo, Pineda et al. estudiaron 184 *single nucleotide polymorphisms* de 18 genes, entre los que se encontraba el polimorfismo Arg72Pro del TP53, en 1058 casos y 1138 controles de raza blanca europea, no encontrando asociación la susceptibilidad al cáncer de vejiga (70), Zhang et al. realizaron un metaanálisis de estudios de casos y controles en el que analizaron 3794 tumores vesicales frente a 4791 controles encontrando una asociación entre el polimorfismo y el riesgo de tumores de vejiga en asiáticos

pero no en caucásicos, y dentro de los asiáticos, asociación con los fumadores (159), y Schrier et al. que realizaron un trabajo comparando 41 pacientes con un tumor primario de vejiga que había progresado emparejados con controles con carcinoma urotelial superficial que no había progresado, demostrando el efecto en el valor pronóstico para la progresión (71). Este punto no fue demostrado en nuestro trabajo, probablemente por la baja frecuencia de progresión que hubo en nuestra serie.

BAT 25 MSI, BAT 26 MSI y D2S123 MSI

Los MSI se hallan mutados en el cáncer vesical en una frecuencia de entre el 1% y el 45%(76) (77) (78), rango que incluye nuestra serie. Como parte del estudio analizamos la asociación entre los microsatélites clásicos y las variables clínicas, demográficas y oncológicas de la muestra.

El microsatélite BAT 26 MSI se asoció con la variable sexo de forma estadísticamente significativa: de los 4 pacientes que lo presentaron 3 fueron mujeres (86,1%) y 1 hombre (13,9%). Varios estudios han generado como hipótesis que variables como el sexo o determinadas enfermedades podrían contribuir a la inestabilidad genética y, por ende, a generar MSI sin haber obtenido resultados que alcancen la significación estadística.

No pudimos demostrar asociación estadísticamente significativa entre los microsatélite BAT 25 MSI y D2S123 ninguna variable clínica, demográfica ni oncológica. En otros trabajos sin embargo se asociaron a una localización específica (tracto urinario superior más que en vejiga) (143), a determinadas franjas de edad (78). La serie de Catto et al. (76) se estudió la diferencia en las frecuencias de aparición de los diferentes MSI según los tumores fueras vesicales o del tracto urinario superior en 87 pacientes, siendo más frecuentes en los del tracto urinario superior, sin que se aporten datos del seguimiento de la serie.

Análisis univariante de la asociación de mutaciones entre sí

Realizamos un análisis univariante para valorar la presencia de asociación entre sí de las diferentes mutaciones estudiadas, no encontrándose ninguna asociación estadísticamente significativa entre ellas, el hecho de que no encontrásemos asociaciones podría deberse a que las vías celulares donde actúan estas mutaciones no están directamente relacionadas entre sí.

No existen en la literatura publicaciones que analicen asociaciones entre exactamente los mismos marcadores. Schrier et al no encontraron asociación entre las mutaciones en p53, p27 y alfa-cateninas en una serie de 41 pacientes diagnosticados de TVNMI (71). Sin embargo, basándose en estudios de expresión del RNA sí que se han definido 5 subtipos moleculares, con una asociación entre las mutaciones en FGFR3, en TERT (transcriptasa inversa de la polimerasa) y la pérdida de heterocigosidad en 9q para los tumores papilares de bajo grado; y asociación de la pérdida de heterocigosidad para 9p y mutaciones en TP53, PTEN, KMT2D en los tumores infiltrantes de alto grado (149). En el estudio de Kompier et al. (86), en el que se analizaron simultáneamente FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS y PIK3CA en 257 tumores vesicales primarios y en 184 recurrencias, se concluyó que las mutaciones en FGFR3 eran mutuamente excluyentes con las mutaciones en la familia RAS, y concurrentes con las mutaciones en PIK3CA.

Análisis de la evolución de la enfermedad: supervivencia libre de recidiva y supervivencia libre de progresión

Veinticinco de los 74 pacientes recidivaron, con una mediana de tiempo hasta la recidiva de 8 meses. La SLR fue del 73,3% a los 12 meses (EE: 5,3) y 64,1% (EE:5,8) a los 24 meses. Tres de los 74 pacientes progresaron, con una mediana de tiempo hasta la progresión de 14 meses. La

supervivencia libre de progresión (SLR) a los 12 meses fue del 98,50% (EE: 1,50) y a 24 meses, del 95,40 % (EE: 2,60).

En la literatura la SLR al año para el TVNMI va del 39 al 76% y a 5 años entre el 22 y el 54%, presentando así nuestros resultados una SLR a 12 meses en la parte superior del rango. La SLP al año oscila entre el 83 y el 99% y a 5 años entre el 22 y el 54%, siendo los factores que más influyen en la progresión el estadio y el grado (36). Una posible explicación para los buenos resultados de nuestra serie en este aspecto puede ser la exhaustividad y profundidad con la que se realizó la RTUv al formar parte de un estudio. El hecho de mandar la base por separado parece demostrar que disminuye los pacientes con tumor residual, dado que se ha postulado como causa de recidiva y progresión en otras series (160).

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre la SLR y los antecedentes personales. Es llamativo en este punto que pese a que 29 pacientes (39,2%) eran fumadores activos y 31 pacientes (41,9%) ex fumadores no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el hábito tabáquico y la frecuencia de recidiva, a pesar de ser un reconocido factor de riesgo (5), pudiendo deberse esta ausencia de efecto que la definición empleada era más restrictiva que en otros trabajos (161).

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la SLR y el número de RTUs previas, con una HR de 5,13 para los pacientes que habían sido sometidos a 3 o más RTUv (IC95%: 2,12-12,36). Estos resultados van en consonancia con los resultados de Sylvester et al (162) en los que en un análisis combinado de 2596 pacientes que presentaban tumores de vejiga superficiales procedentes de 7 ensayos de la EORTC obtuvieron como variable significativa para predecir recurrencia al año el número de recurrencias previas (HR: 1,42; $p < 0,001$).

No encontramos asociación en cuanto al resto de variables oncológicas (estadio, grado, uso de MMC o BCG y afectación del TUS), la SLR y la SLP, a pesar de ser algunos de ellos factores de reconocida influencia tanto por las tablas de la EORTC como por las de grupo CUETO, y esto posiblemente sea debido al bajo número de pacientes de la muestra estudiada.

Respecto a las mutaciones, encontramos una asociación significativa en cuanto a la SLR con D2S123 MSI, con una HR de 5,44 para los pacientes que presentaban la mutación (IC95%: 1,83-16,16) frente a los que no. Si asumimos que los microsatélites son secuencias cuya función es reparadora, y el fallo en la reparación de esas mutaciones se traduce en la inestabilidad de los microsatélites que podría suponer una mayor probabilidad de recidiva tumoral, podemos suponer que se produjo este fenómeno en nuestra serie.

En cuanto a la progresión, a pesar de haber seleccionado TVNMI de riesgo intermedio y alto, no se encontraron factores asociados a la SLP en nuestra serie, debido al reducido número de pacientes estudiados y a una frecuencia del evento por debajo de lo esperado.

No encontramos asociaciones significativas entre KRAS 12 con la SLR y la SLP, aunque como mencionamos antes, nuestra frecuencia de esta mutación es más baja que la reportada en la literatura, que va del 4 al 11% (86) (163) estos resultados podrían ir en contra de nuestra hipótesis de trabajo, pero hay que tener en cuenta que no son dos series comparables ya que nuestra serie solo analiza TVNMI.

La frecuencia de mutaciones en KRAS en el cáncer vesical puede ser explicada por el hecho de ser una mutación mutuamente excluyente con las mutaciones de FGFR3, que es el gen más frecuentemente mutado en el TVNMI (86) (87). En el trabajo de Kompier et al. no se encontró una asociación de la mutación de este gen y la SLR, SLP ni la supervivencia cáncer específica. Además las diferentes frecuencias de la mutación en las diferentes series ponen de manifiesto la presencia de grandes diferencias poblacionales.

Respecto al polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 tampoco obtuvimos conclusiones significativas acerca de su aparición y la SLR y la SLP. Entre los homocigotos mutados, a los 12 meses estaban libres de recidiva 34 pacientes, lo que representa una SLR del 75,20% (EE: 6,20), y a los 24 meses estaban libres de recidiva 26 pacientes que representa una SLR del 63,40 (EE: 7,10). Entre los heterocigotos, 15 pacientes estaban libres de recidiva a los 12 y 24 meses meses, lo que representa una SLR del 68,20 % (EE: 9,90).

Estos resultados son consistentes con el único estudio español, en el que se analizaron 184 SNP de 18 genes en 1058 casos y 1138 controles sacados del estudio sobre cáncer de vejiga EPICURO, en el que tampoco se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el Arg72Pro y el cáncer de vejiga (70). Sin embargo, en algunas series asiáticas sí se ha encontrado asociación como se comentó anteriormente (67)(69), pudiendo dejar entrever cierto grado de asociación con la raza.

En cuanto a su relación con la progresión, existen series de pacientes en los que se detectó la mutación de p53 mediante inmunohistoquímica, que han presentado un peor pronóstico, con un mayor riesgo de progresión para los pacientes que presentaban la mutación respecto a los pacientes que no la presentaban. (73) (74).

Schrier et al. analizaron una serie de 41 pacientes encontrando que los pacientes que presentaban p53 mutado presentaban un mayor riesgo de progresión OR: 3,4 (95CI: 0,8-15,2) (71). Moonen et al. observaron una tendencia a una peor evolución clínica en tumores de alto riesgo (72), En una serie de pacientes que presentaban tumores T1-T2, Shariat et al. demostraron una mayor mortalidad cáncer específica (73). En la revisión de 3421 pacientes de 25 centros diferentes realizada por Goebell et al. mostraron que la positividad para p53 se asociaba a la progresión tumoral en tumores T1 y avanzados pero no en tumores Ta. (74)

Finalmente, en el mayor y más actual metaanálisis realizado hasta la fecha, el polimorfismo no se asoció globalmente al cáncer de vejiga, encontrándose una asociación en asiáticos pero no en caucásicos en el análisis de subgrupos por razas (67). En este metanálisis se incluyeron 16 estudios, 8 de asiáticos, 4 caucásicos, 2 indios, 1 brasileño y 1 tunecino. EL tamaño muestral varió entre 47 a 615 (media: 146,5) en los casos, y de 34 a 598 (media: 200) en los controles. La mayoría de estudios eran de casos y controles, con una muestra era pequeña.

Análisis multivariante

En el estudio multivariante , encontramos diferencias estadísticamente significativas para mayor riesgo de recidiva en pacientes con D2S123 positivo (HR: 5,15; p: 0,004) y con un número de RTUs previas mayor a 2 (HR: 5,07; p:0,00) ambos ajustados al estadio y grado.

Nuestro modelo basado en las recidivas del tumor y la positividad de D2S123, ajustado para el grado y estadio, tiene una capacidad de discriminación del 0,74 ($p < 0,001$), no habiendo encontrado en la literatura modelos similares que relacionen ambos factores con la recidiva.

Esto podría poner de manifiesto que los tumores que presentasen dicha mutación podrían ser un subgrupo más recidivante y que al combinarlo con el número de recidivas previas del tumor pudiésemos tratar a los tumores que presentasen ambas características de una manera más agresiva o realizar un seguimiento más intensivo. De confirmarse este hallazgo por otros estudios pudiera servir para mejorar la estrategia de seguimiento de estos tumores.

No obstante, y a pesar de la buena capacidad de discriminación que aporta el modelo, hay que tomar estos hallazgos con cautela debido a las limitaciones de nuestro estudio, como el número bajo de pacientes, la ausencia del grupo control y el corto tiempo de seguimiento.

CONSIDERACIONES FINALES

Aunque hay una gran cantidad de trabajos que investigan diferentes biomarcadores, en la actualidad la aplicabilidad de los mismos aún es baja. Así, pese a la obtención de resultados prometedores en muchos de estos estudios existen diferencias en los mismos según las series siendo diversas también las cifras de prevalencia de mutaciones obtenida en ellas.

Nosotros hemos analizado 3 mutaciones en 74 pacientes. Este tamaño muestral, es comparable al de muchos otros artículos revisados, si bien, para el análisis de la probabilidad de progresión puede haber resultado corto. Además, otra de las principales limitaciones de nuestro estudio es la carencia de grupo control.

Como hemos visto existen influencias diferentes respecto al sexo, antecedentes personales, factores ambientales y factores étnicos que hacen muy difícil encontrar series homogéneas y que hagan posible hacer comparaciones realistas. Además la mayoría de series son cortas, de pacientes de zonas geográficas muy concretas y los métodos de detección de las mutaciones varían de unas series a otras, haciendo más difícil todavía el obtener conclusiones.

En nuestro caso, se detectó una asociación estadísticamente significativa entre el D2S123 MSI y la SLR, confirmada en el análisis multivariante y con un índice c de Harrel de 0,76, lo cual pone en valor la capacidad de discriminar de este MSI.

Creemos que este estudio da paso a líneas de investigación futuras, que utilicen aquellos métodos validados considerados como el gold-standard para esta mutación; y sean prospectivas, multiinstitucionales e internacionales, realizadas con grupo control, de forma que aglutinen una cantidad de pacientes lo suficientemente representativa que permitan hacer del estudio de biomarcadores una realidad con aplicabilidad en la práctica clínica diaria.

CONCLUSIONES

1. El polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 se asocia al estadio de forma significativa, en pacientes diagnosticados de TVNMI de riesgo intermedio y alto.
2. La presencia de BAT26 MSI se asocia al sexo femenino de forma significativa, en los pacientes diagnosticados de TVNMI de riesgo intermedio y alto.
3. No existen asociaciones de la mutación entre los codones 12 y 13 del gen KRAS, el polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 y los MSI BAT25, BAT26 y D2S123.
4. D2S123 MSI y el número de RTUv previas mayor a 2 se asocia de forma significativa con la SLR, en los pacientes diagnosticados de TVNMI de riesgo intermedio y alto.
5. Existe una asociación entre D2S123 MSI y la recidiva en los estadios pTa, al ajustar el modelo al estadio ($p < 0,05$), en los pacientes diagnosticados de TVNMI de riesgo intermedio y alto.
6. El modelo creado para predecir qué pacientes recidivarán en aquellos que han presentado más de dos recidivas tumorales y que presentan D2S123 MSI tiene un índice de discriminación del 0,74 ($p < 0,001$).

BIBLIOGRAFÍA

1. Cancer of the Urinary Bladder - SEER Stat Fact Sheets [Internet]. [citado 5 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html>
2. Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report 2014. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization; 2014.
3. El Cáncer en España 2016 [Internet]. [citado 6 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://www.seom.org/es/prensa/el-cancer-en-espanyacom/105460-el-cancer-en-espana-2016?showall=1>
4. Globocan 2012 - Home [Internet]. [citado 6 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
5. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. JAMA. 17 de agosto de 2011;306(7):737-45.
6. Cumberbatch MG, Rota M, Catto JWF, La Vecchia C. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. Eur Urol. septiembre de 2016;70(3):458-66.
7. Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. Eur Urol. febrero de 2013;63(2):234-41.
8. Rothman N, Garcia-Closas M, Chatterjee N, Malats N, Wu X, Figueroa JD, et al. A multi-stage genome-wide association study of bladder cancer identifies multiple susceptibility loci. Nat Genet. noviembre de 2010;42(11):978-84.
9. TNM | UICC [Internet]. [citado 13 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://www.uicc.org/resources/tnm>
10. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. Am J Surg Pathol. diciembre de 1998;22(12):1435-48.
11. IARC Publications Website - Home [Internet]. [citado 13 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://publications.iarc.fr/>
12. MacLennan GT, Kirkali Z, Cheng L. Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms. Eur Urol. abril de 2007;51(4):889-97; discussion 897-898.
13. Mishriki SF, Nabi G, Cohen NP. Diagnosis of urologic malignancies in patients with asymptomatic dipstick hematuria: prospective study with 13 years' follow-up. Urology. enero de 2008;71(1):13-6.

14. Rodgers MA, Hempel S, Aho T, Kelly JD, Kleijnen J, Westwood M. Diagnostic tests used in the investigation of adult haematuria: A systematic review. *BJU Int.* diciembre de 2006;98(6):1154-60.
15. Caraway NP, Katz RL. A review on the current state of urine cytology emphasizing the role of fluorescence in situ hybridization as an adjunct to diagnosis. *Cancer Cytopathol.* 25 de agosto de 2010;118(4):175-83.
16. Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, Aprikian AG, Tanguay S, Kassouf W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol.* febrero de 2015;33(2):66.e25-31.
17. Palou J, Rodríguez-Rubio F, Huguet J, Segarra J, Ribal MJ, Alcaraz A, et al. Multivariate analysis of clinical parameters of synchronous primary superficial bladder cancer and upper urinary tract tumor. *J Urol.* septiembre de 2005;174(3):859-61; discussion 861.
18. Holmäng S, Hedelin H, Anderström C, Holmberg E, Johansson SL. Long-term followup of a bladder carcinoma cohort: routine followup urography is not necessary. *J Urol.* julio de 1998;160(1):45-8.
19. Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Huguet-Pérez J, Vicente-Rodríguez J. Upper urinary tract tumors after primary superficial bladder tumors: prognostic factors and risk groups. *J Urol.* octubre de 2000;164(4):1183-7.
20. Brausi M, Collette L, Kurth K, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, et al. Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy after TUR in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined analysis of seven EORTC studies. *Eur Urol.* mayo de 2002;41(5):523-31.
21. Herr HW, Donat SM. Quality control in transurethral resection of bladder tumours. *BJU Int.* noviembre de 2008;102(9 Pt B):1242-6.
22. Mariappan P, Zachou A, Grigor KM, Edinburgh Uro-Oncology Group. Detrusor muscle in the first, apparently complete transurethral resection of bladder tumour specimen is a surrogate marker of resection quality, predicts risk of early recurrence, and is dependent on operator experience. *Eur Urol.* mayo de 2010;57(5):843-9.
23. Grimm M-O, Steinhoff C, Simon X, Spiegelhalder P, Ackermann R, Vogeli TA. Effect of routine repeat transurethral resection for superficial bladder cancer: a long-term observational study. *J Urol.* agosto de 2003;170(2 Pt 1):433-7.
24. Divrik RT, Sahin AF, Yildirim U, Altok M, Zorlu F. Impact of routine second transurethral resection on the long-term outcome of patients with newly diagnosed pT1 urothelial carcinoma with respect to recurrence, progression rate, and disease-specific survival: a prospective randomised clinical trial. *Eur Urol.* agosto de 2010;58(2):185-90.
25. Jahnson S, Wiklund F, Duchek M, Mestad O, Rintala E, Hellsten S, et al. Results of second-look resection after primary resection of T1 tumour of the urinary bladder. *Scand J Urol Nephrol.* 2005;39(3):206-10.

26. Lazica DA, Roth S, Brandt AS, Böttcher S, Mathers MJ, Ubrig B. Second transurethral resection after Ta high-grade bladder tumor: a 4.5-year period at a single university center. *Urol Int*. 2014;92(2):131-5.
27. Vasdev N, Dominguez-Escrig J, Paez E, Johnson MI, Durkan GC, Thorpe AC. The impact of early re-resection in patients with pT1 high-grade non-muscle invasive bladder cancer. *Ecancermedicalscience*. 2012;6:269.
28. Neuzillet Y, Methorst C, Schneider M, Lebrete T, Rouanne M, Radulescu C, et al. Assessment of diagnostic gain with hexaminolevulinate (HAL) in the setting of newly diagnosed non-muscle-invasive bladder cancer with positive results on urine cytology. *Urol Oncol*. noviembre de 2014;32(8):1135-40.
29. Divrik RT, Yildirim U, Zorlu F, Ozen H. The effect of repeat transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with T1 tumors of the bladder who received intravesical mitomycin: a prospective, randomized clinical trial. *J Urol*. mayo de 2006;175(5):1641-4.
30. Sfakianos JP, Kim PH, Hakimi AA, Herr HW. The effect of restaging transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with nonmuscle invasive bladder cancer treated with intravesical bacillus Calmette-Guérin. *J Urol*. febrero de 2014;191(2):341-5.
31. Dalbagni G, Vora K, Kaag M, Cronin A, Bochner B, Donat SM, et al. Clinical outcome in a contemporary series of restaged patients with clinical T1 bladder cancer. *Eur Urol*. diciembre de 2009;56(6):903-10.
32. Bishr M, Lattouf J-B, Latour M, Saad F. Tumour stage on re-staging transurethral resection predicts recurrence and progression-free survival of patients with high-risk non-muscle invasive bladder cancer. *Can Urol Assoc J J Assoc Urol Can*. mayo de 2014;8(5-6):E306-310.
33. Sylvester RJ, van der Meijden APM, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol*. marzo de 2006;49(3):466-465; discussion 475-477.
34. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñeiro L, Gonzalez M, et al. Predicting nonmuscle invasive bladder cancer recurrence and progression in patients treated with bacillus Calmette-Guerin: the CUETO scoring model. *J Urol*. noviembre de 2009;182(5):2195-203.
35. van Rhijn BWG, Zuiverloon TCM, Vis AN, Radvanyi F, van Leenders GJLH, Ooms BCM, et al. Molecular grade (FGFR3/MIB-1) and EORTC risk scores are predictive in primary non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*. septiembre de 2010;58(3):433-41.
36. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñeiro L, Ojea A, et al. The EORTC tables overestimate the risk of recurrence and progression in patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guérin: external validation of the EORTC risk tables. *Eur Urol*. septiembre de 2011;60(3):423-30.
37. Cambier S, Sylvester RJ, Collette L, Gontero P, Brausi MA, van Andel G, et al. EORTC Nomograms and Risk Groups for Predicting Recurrence, Progression, and Disease-specific and Overall Survival in Non-Muscle-invasive Stage Ta-T1 Urothelial Bladder Cancer

- Patients Treated with 1-3 Years of Maintenance Bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol.* enero de 2016;69(1):60-9.
38. Holmang S, Johansson SL. Stage Ta-T1 bladder cancer: the relationship between findings at first followup cystoscopy and subsequent recurrence and progression. *J Urol.* abril de 2002;167(4):1634-7.
 39. Mariappan P, Smith G. A surveillance schedule for G1Ta bladder cancer allowing efficient use of check cystoscopy and safe discharge at 5 years based on a 25-year prospective database. *J Urol.* abril de 2005;173(4):1108-11.
 40. Soukup V, Babjuk M, Bellmunt J, Dalbagni G, Giannarini G, Hakenberg OW, et al. Follow-up after surgical treatment of bladder cancer: a critical analysis of the literature. *Eur Urol.* agosto de 2012;62(2):290-302.
 41. Holmäng S, Ströck V. Should follow-up cystoscopy in bacillus Calmette-Guérin-treated patients continue after five tumour-free years? *Eur Urol.* marzo de 2012;61(3):503-7.
 42. Allard P, Bernard P, Fradet Y, Têtu B. The early clinical course of primary Ta and T1 bladder cancer: a proposed prognostic index. *Br J Urol.* mayo de 1998;81(5):692-8.
 43. van Rhijn BWG, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol.* junio de 2005;47(6):736-48.
 44. McConkey DJ, Lee S, Choi W, Tran M, Majewski T, Lee S, et al. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urol Oncol.* agosto de 2010;28(4):429-40.
 45. Shirodkar SP, Lokeshwar VB. Potential new urinary markers in the early detection of bladder cancer. *Curr Opin Urol.* septiembre de 2009;19(5):488-93.
 46. Vrooman OPJ, Witjes JA. Molecular markers for detection, surveillance and prognostication of bladder cancer. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc.* marzo de 2009;16(3):234-43.
 47. Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science.* 6 de diciembre de 1996;274(5293):1664-72.
 48. Johnson L, Greenbaum D, Cichowski K, Mercer K, Murphy E, Schmitt E, et al. K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev.* 1 de octubre de 1997;11(19):2468-81.
 49. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* enero de 2003;3(1):11-22.
 50. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):459-65.
 51. Mitin N, Rossman KL, Der CJ. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol CB.* 26 de julio de 2005;15(14):R563-574.

52. Ouerhani S, Bougatef K, Soltani I, Elgaaied ABA, Abbes S, Menif S. The prevalence and prognostic significance of KRAS mutation in bladder cancer, chronic myeloid leukemia and colorectal cancer. *Mol Biol Rep.* junio de 2013;40(6):4109-14.
53. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* 15 de mayo de 2012;72(10):2457-67.
54. Soulières D, Greer W, Magliocco AM, Huntsman D, Young S, Tsao M-S, et al. KRAS mutation testing in the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR therapies. *Curr Oncol Tor Ont.* julio de 2010;17 Suppl 1:S31-40.
55. Karimianpour N, Mousavi-Shafaei P, Ziaee A-A, Akbari MT, Pourmand G, Abedi A, et al. Mutations of RAS gene family in specimens of bladder cancer. *Urol J.* 2008;5(4):237-42.
56. Nanda MS, Sameer AS, Syeed N, Shah ZA, Murtaza I, Siddiqi MA, et al. Genetic aberrations of the K-ras proto-oncogene in bladder cancer in Kashmiri population. *Urol J.* 2010;7(3):168-73.
57. Jiricny J. Mediating mismatch repair. *Nat Genet.* enero de 2000;24(1):6-8.
58. Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene.* 12 de abril de 2004;23(16):2809-18.
59. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 5 de julio de 1991;253(5015):49-53.
60. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature.* 7 de diciembre de 1989;342(6250):705-8.
61. Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D. P53 expression in breast cancer. *Int J Cancer.* 15 de febrero de 1988;41(2):178-83.
62. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 7 de febrero de 1997;88(3):323-31.
63. Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME. Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene.* 13 de marzo de 2006;25(11):1602-11.
64. Liu MC, Gelmann EP. P53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. *Semin Oncol.* junio de 2002;29(3):246-57.
65. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sørli T, et al. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* septiembre de 1994;22(17):3551-5.
66. Liu Z-H, Bao E-D. Quantitative assessment of the association between TP53 Arg72Pro polymorphism and bladder cancer risk. *Mol Biol Rep.* marzo de 2013;40(3):2389-95.
67. Yang Z, Nie S, Zhu H, Wu X, Jia S, Luo Y, et al. Association of p53 Arg72Pro polymorphism with bladder cancer: a meta-analysis. *Gene.* 10 de enero de 2013;512(2):408-13.

68. Santos LEM de C, Guilhen ACT, de Andrade RA, Sumi LG, Ward LS. The role of TP53 PRO47SER and ARG72PRO single nucleotide polymorphisms in the susceptibility to bladder cancer. *Urol Oncol.* junio de 2011;29(3):291-4.
69. Pandith AA, Shah ZA, Khan NP, Rasool R, Afroze D, Yousuf A, et al. Role of TP53 Arg72Pro polymorphism in urinary bladder cancer predisposition and predictive impact of proline related genotype in advanced tumors in an ethnic Kashmiri population. *Cancer Genet Cytogenet.* diciembre de 2010;203(2):263-8.
70. Pineda S, Milne RL, Calle ML, Rothman N, López de Maturana E, Herranz J, et al. Genetic variation in the TP53 pathway and bladder cancer risk. a comprehensive analysis. *PLoS One.* 2014;9(5):e89952.
71. Schrier BP, Vriesema JIJ, Witjes JA, Kiemeny LALM, Schalken JA. The predictive value of p53, p27(kip1), and alpha-catenin for progression in superficial bladder carcinoma. *Eur Urol.* julio de 2006;50(1):76-82.
72. Moonen PMJ, van Balken-Ory B, Kiemeny L a. LM, Schalken JA, Witjes JA. Prognostic value of p53 for high risk superficial bladder cancer with long-term followup. *J Urol.* enero de 2007;177(1):80-3.
73. Shariat SF, Bolenz C, Karakiewicz PI, Fradet Y, Ashfaq R, Bastian PJ, et al. p53 expression in patients with advanced urothelial cancer of the urinary bladder. *BJU Int.* febrero de 2010;105(4):489-95.
74. Goebell PJ, Groshen SG, Schmitz-Dräger BJ, International Study-Initiative on Bladder Cancer (ISBC). p53 immunohistochemistry in bladder cancer--a new approach to an old question. *Urol Oncol.* agosto de 2010;28(4):377-88.
75. Wright M, Beaty JS, Ternent CA. Molecular Markers for Colorectal Cancer. *Surg Clin North Am.* junio de 2017;97(3):683-701.
76. Catto JWF, Azzouzi A-R, Amira N, Rehman I, Feeley KM, Cross SS, et al. Distinct patterns of microsatellite instability are seen in tumours of the urinary tract. *Oncogene.* 27 de noviembre de 2003;22(54):8699-706.
77. Mongiat-Artus P, Miquel C, van der Aa M, Buhard O, Hamelin R, Bangma C, et al. Infrequent microsatellite instability in urothelial cell carcinoma of the bladder in young patients. *Eur Urol.* abril de 2006;49(4):685-90.
78. Giedl J, Schneckepointner R, Filbeck T, Ruemmele P, Hofstaedter F, Burger M, et al. Low frequency of HNPCC-associated microsatellite instability and aberrant MMR protein expression in early-onset bladder cancer. *Am J Clin Pathol.* noviembre de 2014;142(5):634-9.
79. Watson MMC, Berg M, Søreide K. Prevalence and implications of elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides in cancer. *Br J Cancer.* 26 de agosto de 2014;111(5):823-7.
80. Lott S, Wang M, Zhang S, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, Montironi R, et al. FGFR3 and TP53 mutation analysis in inverted urothelial papilloma: incidence and etiological considerations. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* mayo de 2009;22(5):627-32.

81. Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urol Oncol.* agosto de 2010;28(4):401-8.
82. Knowles MA. Role of FGFR3 in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target. *World J Urol.* diciembre de 2007;25(6):581-93.
83. Zhao J, Richter J, Wagner U, Roth B, Schraml P, Zellweger T, et al. Chromosomal imbalances in noninvasive papillary bladder neoplasms (pTa). *Cancer Res.* 15 de septiembre de 1999;59(18):4658-61.
84. Oxford G, Theodorescu D. The role of Ras superfamily proteins in bladder cancer progression. *J Urol.* noviembre de 2003;170(5):1987-93.
85. Mitra AP, Cote RJ. Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:251-85.
86. Kompier LC, Lurkin I, van der Aa MNM, van Rhijn BWG, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PloS One.* 3 de noviembre de 2010;5(11):e13821.
87. Lopez-Knowles E, Hernandez S, Malats N, et al. PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer research* 2006;66:7401-4.
88. Kubota Y, Miyamoto H, Noguchi S, Shuin T, Kitamura H, Xu HJ, et al. The loss of retinoblastoma gene in association with c-myc and transforming growth factor-beta 1 gene expression in human bladder cancer. *J Urol.* agosto de 1995;154(2 Pt 1):371-4.
89. Bensalah K, Montorsi F, Shariat SF. Challenges of cancer biomarker profiling. *Eur Urol.* diciembre de 2007;52(6):1601-9.
90. Bolenz C, Lotan Y. Translational research in bladder cancer: from molecular pathogenesis to useful tissue biomarkers. *Cancer Biol Ther.* 1 de septiembre de 2010;10(5):407-15.
91. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, Murphy WM, Hautmann SH, Hemstreet GP, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology.* diciembre de 2005;66(6 Suppl 1):35-63.
92. Nabi G, Greene D, O'Donnell MO, Donnell MO. Suspicious urinary cytology with negative evaluation for malignancy in the diagnostic investigation of haematuria: how to follow up? *J Clin Pathol.* abril de 2004;57(4):365-8.
93. Glas AS, Roos D, Deutekom M, Zwinderman AH, Bossuyt PM, Kurth KH. Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J Urol.* junio de 2003;169(6):1975-82.
94. Vrooman OPJ, Witjes JA. Urinary markers in bladder cancer. *Eur Urol.* mayo de 2008;53(5):909-16.

95. Lotan Y, Shariat SF, Schmitz-Dräger BJ, Sanchez-Carbayo M, Jankevicius F, Racioppi M, et al. Considerations on implementing diagnostic markers into clinical decision making in bladder cancer. *Urol Oncol.* agosto de 2010;28(4):441-8.
96. Nieder AM, Soloway MS, Herr HW. Should we abandon the FISH test? *Eur Urol.* junio de 2007;51(6):1469-71.
97. Bergman J, Reznichuk RC, Rajfer J. Surveillance of patients with bladder carcinoma using fluorescent in-situ hybridization on bladder washings. *BJU Int.* enero de 2008;101(1):26-9.
98. van der Aa MNM, Zwarthoff EC, Steyerberg EW, Boogaard MW, Nijssen Y, van der Keur KA, et al. Microsatellite analysis of voided-urine samples for surveillance of low-grade non-muscle-invasive urothelial carcinoma: feasibility and clinical utility in a prospective multicenter study (Cost-Effectiveness of Follow-Up of Urinary Bladder Cancer trial [CEFUB]). *Eur Urol.* marzo de 2009;55(3):659-67.
99. de Bekker-Grob EW, van der Aa MNM, Zwarthoff EC, Eijkemans MJC, van Rhijn BW, van der Kwast TH, et al. Non-muscle-invasive bladder cancer surveillance for which cystoscopy is partly replaced by microsatellite analysis of urine: a cost-effective alternative? *BJU Int.* julio de 2009;104(1):41-7.
100. Rouprêt M, Hupertan V, Yates DR, Comperat E, Catto JWF, Meuth M, et al. A comparison of the performance of microsatellite and methylation urine analysis for predicting the recurrence of urothelial cell carcinoma, and definition of a set of markers by Bayesian network analysis. *BJU Int.* junio de 2008;101(11):1448-53.
101. Kim HS, Kim M, Jeong CW, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Presence of lymphovascular invasion in urothelial bladder cancer specimens after transurethral resections correlates with risk of upstaging and survival: a systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol.* noviembre de 2014;32(8):1191-9.
102. O'Donnell MA. Advances in the management of superficial bladder cancer. *Semin Oncol.* abril de 2007;34(2):85-97.
103. Burger M, van der Aa MNM, van Oers JMM, Brinkmann A, van der Kwast TH, Steyerberg EC, et al. Prediction of progression of non-muscle-invasive bladder cancer by WHO 1973 and 2004 grading and by FGFR3 mutation status: a prospective study. *Eur Urol.* octubre de 2008;54(4):835-43.
104. Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y. Predictive value of cell cycle biomarkers in nonmuscle invasive bladder transitional cell carcinoma. *J Urol.* febrero de 2007;177(2):481-7; discussion 487.
105. Kawauchi S, Sakai H, Ikemoto K, Eguchi S, Nakao M, Takihara H, et al. 9p21 index as estimated by dual-color fluorescence in situ hybridization is useful to predict urothelial carcinoma recurrence in bladder washing cytology. *Hum Pathol.* diciembre de 2009;40(12):1783-9.
106. Krüger S, Mess F, Böhle A, Feller AC. Numerical aberrations of chromosome 17 and the 9p21 locus are independent predictors of tumor recurrence in non-invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Int J Oncol.* julio de 2003;23(1):41-8.

107. Zuiverloon TCM, van der Aa MNM, van der Kwast TH, Steyerberg EW, Lingsma HF, Bangma CH, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation analysis on voided urine for surveillance of patients with low-grade non-muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 de junio de 2010;16(11):3011-8.
108. Miyake M, Sugano K, Sugino H, Imai K, Matsumoto E, Maeda K, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation in voided urine is a useful diagnostic marker and significant indicator of tumor recurrence in non-muscle invasive bladder cancer. *Cancer Sci*. enero de 2010;101(1):250-8.
109. Hernández S, López-Knowles E, Lloreta J, Kogevinas M, Amorós A, Tardón A, et al. Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de agosto de 2006;24(22):3664-71.
110. Chakravarti A, Winter K, Wu C-L, Kaufman D, Hammond E, Parliament M, et al. Expression of the epidermal growth factor receptor and Her-2 are predictors of favorable outcome and reduced complete response rates, respectively, in patients with muscle-invasive bladder cancers treated by concurrent radiation and cisplatin-based chemotherapy: a report from the Radiation Therapy Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 de junio de 2005;62(2):309-17.
111. Jimenez RE, Hussain M, Bianco FJ, Vaishampayan U, Tabazcka P, Sakr WA, et al. Her-2/neu overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis in primary and metastatic tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. agosto de 2001;7(8):2440-7.
112. Ravery V, Grignon D, Angulo J, Pontes E, Montie J, Crissman J, et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor and c-erbB2 in the progression of invasive bladder cancer. *Urol Res*. 1997;25(1):9-17.
113. Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE, Herr HW, Netto G, Zhang ZF, et al. Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. junio de 1995;13(6):1384-90.
114. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Melamed J, Zhang ZF, Sheinfeld J, et al. Association of P53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol*. agosto de 1994;152(2 Pt 1):388-92.
115. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, et al. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst*. 6 de enero de 1993;85(1):53-9.
116. Garcia del Muro X, Condom E, Vigués F, Castellsagué X, Figueras A, Muñoz J, et al. p53 and p21 Expression levels predict organ preservation and survival in invasive bladder carcinoma treated with a combined-modality approach. *Cancer*. 1 de mayo de 2004;100(9):1859-67.
117. Lopez-Beltran A, Luque RJ, Alvarez-Kindelan J, Quintero A, Merlo F, Carrasco JC, et al. Prognostic factors in stage T1 grade 3 bladder cancer survival: the role of G1-S modulators

- (p53, p21Waf1, p27kip1, Cyclin D1, and Cyclin D3) and proliferation index (ki67-MIB1). *Eur Urol.* mayo de 2004;45(5):606-12.
118. Tzai T-S, Tsai Y-S, Chow N-H. The prevalence and clinicopathologic correlate of p16INK4a, retinoblastoma and p53 immunoreactivity in locally advanced urinary bladder cancer. *Urol Oncol.* abril de 2004;22(2):112-8.
 119. Margulis V, Lotan Y, Karakiewicz PI, Fradet Y, Ashfaq R, Capitanio U, et al. Multi-institutional validation of the predictive value of Ki-67 labeling index in patients with urinary bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 21 de enero de 2009;101(2):114-9.
 120. Margulis V, Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y. Ki-67 is an independent predictor of bladder cancer outcome in patients treated with radical cystectomy for organ-confined disease. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 de diciembre de 2006;12(24):7369-73.
 121. Quintero A, Alvarez-Kindelan J, Luque RJ, Gonzalez-Campora R, Requena MJ, Montironi R, et al. Ki-67 MIB1 labelling index and the prognosis of primary TaT1 urothelial cell carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol.* enero de 2006;59(1):83-8.
 122. Ramos D, Ruiz A, Morell L, Navarro S, Villamón R, Gil-Salom M, et al. Prognostic value of morphometry in low grade papillary urothelial bladder neoplasms. *Anal Quant Cytol Histol.* octubre de 2004;26(5):285-94.
 123. Heidenblad M, Lindgren D, Jonson T, Liedberg F, Veerla S, Chebil G, et al. Tiling resolution array CGH and high density expression profiling of urothelial carcinomas delineate genomic amplicons and candidate target genes specific for advanced tumors. *BMC Med Genomics.* 31 de enero de 2008;1:3.
 124. Lindgren D, Frigyesi A, Gudjonsson S, Sjö Dahl G, Hallden C, Chebil G, et al. Combined gene expression and genomic profiling define two intrinsic molecular subtypes of urothelial carcinoma and gene signatures for molecular grading and outcome. *Cancer Res.* 1 de mayo de 2010;70(9):3463-72.
 125. Lindgren D, Liedberg F, Andersson A, Chebil G, Gudjonsson S, Borg A, et al. Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q. *Oncogene.* 27 de abril de 2006;25(18):2685-96.
 126. Mitra AP, Pagliarulo V, Yang D, Waldman FM, Datar RH, Skinner DG, et al. Generation of a concise gene panel for outcome prediction in urinary bladder cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 de agosto de 2009;27(24):3929-37.
 127. Serizawa RR, Ralfkiaer U, Steven K, Lam GW, Schmiedel S, Schüz J, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis of bladder cancer reveals an additive diagnostic value of FGFR3 mutations and hypermethylation events. *Int J Cancer.* 1 de julio de 2011;129(1):78-87.
 128. Cabello MJ, Grau L, Franco N, Orenes E, Alvarez M, Blanca A, et al. Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes in bladder cancer. *J Mol Diagn JMD.* enero de 2011;13(1):29-40.

129. Catto JWF, Azzouzi A-R, Rehman I, Feeley KM, Cross SS, Amira N, et al. Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de mayo de 2005;23(13):2903-10.
130. Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Chatterjee A, Rosenbaum E, Van Criekinge W, et al. Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. *J Natl Cancer Inst*. 19 de julio de 2006;98(14):996-1004.
131. Lin H-H, Ke H-L, Huang S-P, Wu W-J, Chen Y-K, Chang L-L. Increase sensitivity in detecting superficial, low grade bladder cancer by combination analysis of hypermethylation of E-cadherin, p16, p14, RASSF1A genes in urine. *Urol Oncol*. diciembre de 2010;28(6):597-602.
132. Yates DR, Rehman I, Abbod MF, Meuth M, Cross SS, Linkens DA, et al. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 de abril de 2007;13(7):2046-53.
133. Ali-El-Dein B, Sarhan O, Hinev A, Ibrahiem E-HI, Nabeeh A, Ghoneim MA. Superficial bladder tumours: analysis of prognostic factors and construction of a predictive index. *BJU Int*. septiembre de 2003;92(4):393-9.
134. Baak JPA, Bol MGW, van Diermen B, Janssen E a. M, Buhr-Wildhagen SBK, Mestad O, et al. DNA cytometric features in biopsies of TaT1 urothelial cell cancer predict recurrence and stage progression more accurately than stage, grade, or treatment modality. *Urology*. junio de 2003;61(6):1266-72.
135. Bellaoui H, Chefchaoui MC, Lazrak N, Khalfaoui LC, Yassine F, Elhamany Z. [Flow cytometric DNA analysis and cytology in diagnosis and prognosis of bladder tumors: preliminary results of a comparative study of bladder lavage]. *Ann Urol*. enero de 2002;36(1):45-52.
136. Bol MGW, Baak JPA, Diermen B, Janssen E a. M, Buhr-Wildhagen SBK, Kjellevoid K-H. Correlation of grade of urothelial cell carcinomas and DNA histogram features assessed by flow cytometry and automated image cytometry. *Anal Cell Pathol J Eur Soc Anal Cell Pathol*. 2003;25(3):147-53.
137. Caraway NP, Khanna A, Payne L, Kamat AM, Katz RL. Combination of cytologic evaluation and quantitative digital cytometry is reliable in detecting recurrent disease in patients with urinary diversions. *Cancer*. 25 de octubre de 2007;111(5):323-9.
138. Falkman K, Tribukait B, Nyman CR, Larsson P, Norming U. S-phase fraction in superficial urothelial carcinoma of the bladder--a prospective, long-term, follow-up study. *Scand J Urol Nephrol*. 2004;38(4):278-84.
139. Loughman NT, Lin BPC, Dent OF, Newland RC. DNA ploidy of bladder cancer using bladder biopsy supernate specimens. *Anal Quant Cytol Histol*. junio de 2003;25(3):146-58.
140. Crew JP, O'Brien T, Bicknell R, Fuggle S, Cranston D, Harris AL. Urinary vascular endothelial growth factor and its correlation with bladder cancer recurrence rates. *J Urol*. marzo de 1999;161(3):799-804.

141. Ioachim E, Michael M, Salmas M, Michael MM, Stavropoulos NE, Malamou-Mitsi V. Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha expression in bladder cancer and their associations with other angiogenesis-related proteins. *Urol Int.* 2006;77(3):255-63.
142. Palit V, Phillips RM, Puri R, Shah T, Bibby MC. Expression of HIF-1alpha and Glut-1 in human bladder cancer. *Oncol Rep.* octubre de 2005;14(4):909-13.
143. Catto JWF, Miah S, Owen HC, Bryant H, Myers K, Dudziec E, et al. Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res.* 1 de noviembre de 2009;69(21):8472-81.
144. Veerla S, Panagopoulos I, Jin Y, Lindgren D, Höglund M. Promoter analysis of epigenetically controlled genes in bladder cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* mayo de 2008;47(5):368-78.
145. Wallerand H, Robert G, Bernhard J-C, Ravaud A, Ferrière J-M. [Targeted therapy for locally advanced and/or metastatic bladder cancer]. *Progres En Urol J Assoc Francaise Urol Soc Francaise Urol.* julio de 2008;18(7):407-17.
146. Bellmunt J, Hussain M, Dinney CP. Novel approaches with targeted therapies in bladder cancer. Therapy of bladder cancer by blockade of the epidermal growth factor receptor family. *Crit Rev Oncol Hematol.* 27 de junio de 2003;46 Suppl:S85-104.
147. Black PC, Agarwal PK, Dinney CPN. Targeted therapies in bladder cancer--an update. *Urol Oncol.* octubre de 2007;25(5):433-8.
148. Katkoori VR, Jia X, Shanmugam C, Wan W, Meleth S, Bumpers H, et al. Prognostic significance of p53 codon 72 polymorphism differs with race in colorectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 de abril de 2009;15(7):2406-16.
149. Audenet F, Attalla K, Sfakianos JP. The evolution of bladder cancer genomics: What have we learned and how can we use it? *Urol Oncol.* julio de 2018;36(7):313-20.
150. Tan TZ, Rouanne M, Tan KT, Huang RY-J, Thiery J-P. Molecular Subtypes of Urothelial Bladder Cancer: Results from a Meta-cohort Analysis of 2411 Tumors. *Eur Urol.* marzo de 2019;75(3):423-32.
151. Apollo A, Ortenzi V, Scatena C, Zavaglia K, Aretini P, Lessi F, et al. Molecular characterization of low grade and high grade bladder cancer. *PLoS One.* 2019;14(1):e0210635.
152. Nassar AH, Umeton R, Kim J, Lundgren K, Harshman L, Van Allen EM, et al. Mutational Analysis of 472 Urothelial Carcinoma Across Grades and Anatomic Sites. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 28 de diciembre de 2018;
153. Watson MMC, Berg M, Søreide K. Prevalence and implications of elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides in cancer. *Br J Cancer.* 26 de agosto de 2014;111(5):823-7.
154. Fankhauser CD, Mostafid H. Prevention of bladder cancer incidence and recurrence: nutrition and lifestyle. *Curr Opin Urol.* enero de 2018;28(1):88-92.

155. Regidor E, Gutiérrez-Fisac JL, de los Santos Ichaso M, Fernández E. Trends in principal cancer risk factors in Spain. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. mayo de 2010;21 Suppl 3:iii37-42.
156. Cambier S, Sylvester RJ, Collette L, Gontero P, Brausi MA, van Andel G, et al. EORTC Nomograms and Risk Groups for Predicting Recurrence, Progression, and Disease-specific and Overall Survival in Non-Muscle-invasive Stage Ta-T1 Urothelial Bladder Cancer Patients Treated with 1-3 Years of Maintenance Bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol*. enero de 2016;69(1):60-9.
157. Pandith AA, Shah ZA, Khan NP, Rasool R, Afroze D, Yousuf A, et al. Role of TP53 Arg72Pro polymorphism in urinary bladder cancer predisposition and predictive impact of proline related genotype in advanced tumors in an ethnic Kashmiri population. *Cancer Genet Cytogenet*. diciembre de 2010;203(2):263-8.
158. Mongiat-Artus P, Miquel C, van der Aa M, Buhard O, Hamelin R, Bangma C, et al. Infrequent microsatellite instability in urothelial cell carcinoma of the bladder in young patients. *Eur Urol*. abril de 2006;49(4):685-90.
159. Zhang L, Wang Y, Qin Z, Li R, Cong R, Ji C, et al. TP53 codon 72 Polymorphism and bladder cancer risk: a meta-analysis and emphasis on the role of tumor or smoking status. *J Cancer*. 2018;9(19):3522-31.
160. Richterstetter M, Wullich B, Amann K, Haeberle L, Engehausen DG, Goebell PJ, et al. The value of extended transurethral resection of bladder tumour (TURBT) in the treatment of bladder cancer. *BJU Int*. julio de 2012;110(2 Pt 2):E76-79.
161. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*. 17 de agosto de 2011;306(7):737-45.
162. Sylvester RJ, Brausi MA, Kirkels WJ, Hoeltl W, Calais Da Silva F, Powell PH, et al. Long-term efficacy results of EORTC genito-urinary group randomized phase 3 study 30911 comparing intravesical instillations of epirubicin, bacillus Calmette-Guérin, and bacillus Calmette-Guérin plus isoniazid in patients with intermediate- and high-risk stage Ta T1 urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol*. mayo de 2010;57(5):766-73.
163. Ouerhani S, Bougateg K, Soltani I, Elgaai ABA, Abbes S, Menif S. The prevalence and prognostic significance of KRAS mutation in bladder cancer, chronic myeloid leukemia and colorectal cancer. *Mol Biol Rep*. junio de 2013;40(6):4109-14.

